

“十二五”国家重点图书出版规划项目
国家出版基金项目

生命之窗
——生命科学前沿纵览

总 主 编 鞠 躬
陈志南
执行总主编 刘宏颀

发育生物学

主 编 张金山



第四军医大学出版社

生命之窗——生命科学前沿纵览

总主编　鞠躬　陈志南　执行总主编　刘宏颀

《生物化学与分子生物学》《生理学》《免疫学》
《细胞生物学》《发育生物学》《神经生物学》
《疼痛生物学》《医学遗传学》《病原生物学》



ISBN 978-7-5662-0489-9



定价：38.00元



"十二五"国家重点图书出版规划项目
国家出版基金项目

生命之窗
——生命科学前沿纵览

总主编 鞠躬
陈志南
执行总主编 刘宏颀

发育生物学

主编 张金山

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目（CIP）数据

生命之窗：生命科学前沿纵览. 发育生物学/张金山主编. —西安：第四军医大学出版社，2014.6

ISBN 978-7-5662-0489-9

Ⅰ.①发…　Ⅱ.①张…　Ⅲ.①医学-发育生物学　Ⅳ.①R329.1

中国版本图书馆CIP数据核字（2014）第146268号

fayushengwuxue

发育生物学

出版人：富　明　　责任编辑：富　明　汪　英

出版发行：第四军医大学出版社

地址：西安市长乐西路17号　邮编：710032

电话：029-84776765　　传真：029-84776764

网址：http：//press. fmmu. edu. cn

制版：新纪元文化传播

印刷：中煤地西安地图制印有限公司

版次：2014年6月第1版　2014年6月第1次印刷

开本：787×1092　1/16　　印张：16.25　彩插1页　　字数：200千字

书号：ISBN 978-7-5662-0489-9/R·1386

定价：38.00元

生命之窗——生命科学前沿纵览

《发育生物学》编委会

主　编　张金山

副主编　李　臻　张远强

编　者　（按姓氏笔画排序）

王　卉　李　伟　李　臻　吴智群

张远强　张金山　金晓航　周劲松

赵　洁　胡成虎



总主编　鞠　躬

中国科学院院士

第四军医大学神经生物学教研室主任，全军神经科学研究所所长。我国现代神经解剖学奠基人之一。先后担任过国家自然科学奖评审委员会委员，973（筹备）15人专家组成员，何梁何利基金专业评审组成员，陈嘉庚科学奖医学组评奖委员会委员，邵逸夫奖推荐人，吴阶平医学奖推荐人，Japan Prize推荐人。自1987年起任*Neuroscience*编委，目前是两位中国编委之一。



总主编　陈志南

中国工程院院士

第四军医大学细胞工程研究中心、细胞生物学国家重点学科主任、教授，博士生导师。"长江学者与创新团队发展计划"创新团队、军队科技创新群体、总后优秀教学团队带头人。兼任重大新药创制国家科技重大专项技术副总师，国家生物产业咨询委员会专家，863计划生物和医药技术领域专家，国家药典委员会委员，973计划项目首席科学家，中国细胞生物学会副理事长兼细胞工程与转基因生物分会会长，《生物化学》（*J Biol Chem*）、《中国科学C辑——生命科学》编委，美国癌症研究会、化学学会会员。

执行总主编　刘宏颀

理学博士，专业技术大校。生于古城西安，先后就读于西北大学和北京大学。一直从事药用植物学、植物解剖学、细胞生物学、细胞工程学等的教学和科研工作。知天命之年甫过，由理转文。现从事医学伦理学、自然辩证法和科学文化的教学与学术研究。曾担任第四军医大学科研部副部长、陕西省细胞生物学学会秘书长。现担任陕西省医学会医学科普分会副主任委员，陕西省动物学会副理事长，《医学争鸣》杂志编委。

主　编　张金山

第四军医大学人体解剖与组织胚胎学教研室副教授，博士。1990 年毕业于第四军医大学临床医学系（6 年制），获医学学士学位；1995 年获组织学与胚胎学硕士学位，1998 年获病理学与病理生理学博士学位。担任中国解剖学会科普工作委员会委员、陕西省解剖学会秘书长兼常务理事、陕西省细胞生物学会理事等学术职务。多年来一直从事基础医学的教学与科研工作。发表学术论文 50 余篇，参编学术著作 7 部。负责完成国家自然科学基金项目 3 项。

序 1

鞠 躬

随着研究技术的发展及多学科的综合、交叉研究的进展，生命科学在20世纪后叶已成为前沿学科，有多项证据表明生命科学的巨大潜力与发展态势：其一是每年都有大量的论文发表，以我近年关注的脊髓损伤研究为例，仅2013年就有相关论文数以万计；其二是自俄国巴甫洛夫于1901年获得诺贝尔奖以来，已经有数百位与生命科学相关的诺贝尔奖得主产生；其三是政府对生命科学研究的巨大投入，如2013年4月2日，美国总统奥巴马宣布了BRAIN（Brain Research through Advancing Innovative Meurotechnologies）项目正式启动，该项目也称作Brain Activity Map Project，是一项合作研究，目的在于标记出人类脑内每一个神经元的活动，本计划在未来10年中每年将需要3亿美元。

生活在当今的生命科学家所面临的挑战、机遇，每时每刻都在变化、发展着。从事生命科学研究的人员即使追踪本专业的相关文献已非易事，何况研究生们。《生命之窗——生命科学前沿纵览》丛书，以生命科学研究前沿内容为切入点，涵盖生物化学与分子生物学、神经生物学、免疫学、发育生物学、医学遗传学、细胞生物学、疼痛生物学、生理学、病原生物学等九大学科，每个学科选取多个

具有代表方向的课题，并配有一定数量的插图，力求从不同侧面和角度充分展示相关领域近年来的研究成果和发展态势，从而为读者提供一扇纵览生命科学的窗口，使读者在较短时间里管窥生命科学的发展动态和热点问题，以激发年轻学子深入探索的兴趣，同时为研究者开展高水平科学研究提供有益的启示。

作为一位从事生命科学60余载的研究者，忍不住说：“幸哉，中国的生命科学家和莘莘学子！”

序 2

陈志南

自然的本质，生命的奥秘，是人类科学探索中的永恒命题。伴随着一系列激动人心的发现，生命科学，这个一个世纪以前初生的婴儿，从蹒跚学步，到茁壮成长。今天，它正在改变着人类的生活甚至命运，冲击着人类固有的世界观与信仰。

不论是抗击癌症的利器——单克隆抗体药物，还是人类器官再造的希望——干细胞培养；不论是早已被生命科学工作者们娴熟操作的基因工程，还是如雨后春笋般蓬勃发展的3D打印技术等，每一项生命科学领域的突破与进展都标志着人类文明前进的脚步。

强大的工具需要应用，先进的技术需要传承。尽管生命科学已经为我们的生活带来了革命性的改变，但纷繁的内容、复杂的理论让很多人望而生畏。此时，这套《生命之窗——生命科学前沿纵览》就如同它的名字一样，为广大读者开启了一扇了解生命科学、读懂生命科学、应用生命科学的窗户，而这扇窗户里则充满了各种各样美丽的风景。全套图书用风趣的语言、生动的举例，为我们描绘了分子生物学的千变万化、神经生物学的阡陌交通、细胞生物学的变幻莫测……针对一系列具有代表性的问题，循序渐进，环环相扣，将我们引入一个精彩的生命科学世界。这样一套深入浅出、引人入

胜的图书不仅有助于人们对知识的掌握，更有利于科技的传承，意义深远。

探索和发现是人类的本能，也是人类文明发展至今的原动力。人们往往是这样，知道得越多，越知世界之大、未知之多。凭已知之道，探未知之谜是学术和科学的真谛。现在，就让我们从这些已经打开的生命科学之窗开始，一同探寻生命的秘密，畅游科学的海洋！

序 3

刘宏颀

生命科学是21世纪发展最为迅猛的学科领域之一，新技术不断涌现，新成果层出不穷，新名词应接不暇，这已成为新世纪生命科学的突出特征。如果试图涉足生命科学前沿领域一探究竟，更会令人眼花缭乱、莫衷一是，真可谓“乱花渐欲迷人眼，洞察秋毫非等闲”。

面对如此态势，我们思考的最多的问题就是，面对飞速增加的海量生命科学新知识，如何能在当下有所作为。为此，经过深入思考和讨论，一个大胆的构想萌生了：能否为关注生命科学的大众读者编写一套图书，用科普的形式介绍生命科学若干前沿领域的发展动态和最新进展，其中穿插研究的背景知识和人物介绍，用科普的笔触，围绕饶富兴趣的主题，勾勒出一幅相关领域的基本轮廓，从而使读者不致因观察“万花筒”而头晕目眩，而是推开一扇扇窗户，让清新之风扑面而来，美丽景致直入眼眸，于是《生命之窗——生命科学前沿纵览》应运而生。

生命科学学科门类众多，我们首先以基础医学作为切入点，分别选取了细胞生物学、分子生物学与生物化学、神经生物学等公认的生命科学前沿学科，同时囊括了免疫学、医学遗传学、发育生物学、疼痛生物学、病原生物学以及生理学，这些学科的总汇可以基本涵盖生命科学的整体面貌。丛书按学科领域分册出版，共九个分

册，每个分册选取多个视点，用简洁的表述加以论述，力求形成面的印象，体现出科学性、新颖性、可读性的有机结合。如果作一类比，就仿佛是在一间封闭的居室开设了九扇窗户，雅室蹀躞，从不同的窗户向外瞭望，读者可移步换景，既可放眼远眺，又可趋近细察，新鲜空气盈满居室，无限风光悉收眼底，这不能不说是一件快哉事也。

窗户易开，而窗外的风光景物则需要精心打理，这就需要物色一批善于“种花植树”的“园艺师”，他们应当富有构建景观的热情，具有生物学知识和培植花木的耐心。所以丛书特别邀请了一批年富力强的中青年学术骨干，由他们牵头组织各分册的撰写，可以说，经他们之手构建的“园林景观”，应当会因独特的创意、奇妙的风格和别具一格的匠心而令观赏者获得超乎寻常的体验。

开窗置景，是本书的出发点和落脚点，为了做到这一点，需要编写者具备创新的勇气和开拓的锐气，善于用科普的语言讲述生命科学前沿的“故事”，这毫无疑问是一种全新的尝试和挑战。为此，所有参编者都付出了大量的心血和艰辛的汗水。如果呈现在您面前的每一分册能够带给您一些启迪或感悟，那么一切的付出都是值得的。当然，如果未能饱您眼福或阅后仍觉不过瘾，只要能激发起您的兴趣，那么进一步的探究就自然会成为您情理之中的选择了。

“会到白云长取醉，不能窗下读闲书”——若此，我们当静思；“竹树日已滋，轩窗渐幽兴”——若此，我们当欣然；“溪岚漠漠树重重，水槛山窗次第逢”——若此，我们当释怀；“深浅檐花千万枝，碧纱窗外啭黄鹂”——若此，我们当愉悦；“坐久不知香在堂，开窗时有蝶飞来”——若此，我们当快意；“酒阑展卷山窗下，习习香从纸上来”——若此，我们当心畅；“远岫如近见，千重一窗里”——若此，我们当拊掌。

唯愿：启开九扇窗，骋目睹春光。

前言

张金山

发育生物学的历史可以追溯至2000多年前。古代中国对鸡人工孵化技术的掌握和应用比欧美各国均早，史料有“正月孵杼”的记载。公元前5世纪，古希腊医生希波克拉底对鸡胚的发育进行了逐日的观察，并写成了《论动物的发生》一书，这是人类历史上首部关于生物体发育的著作。当今，发育生物学整合了生物学和医学的众多分支学科，特别是细胞生物学、遗传学和分子生物学等，这些学科研究技术的进步，极大地促进了发育生物学的发展，使之成为生命科学领域中发展最快、最具挑战性和最令人感兴趣的前沿学科之一。目前，国内许多高等医药院校和综合类高校的生物科学专业均开设了发育生物学课程。

发育生物学的经典研究内容包括生殖细胞、受精及其调节、胚胎发育、生后发育、衰老和死亡等过程及其机制。如今，发育生物学的研究领域还涵盖干细胞生物学、生殖和胚胎工程以及环境发育生物学等分支学科。发育生物学探讨从受精一直到胚胎器官形成期间发育的基本过程，偏重于研究细胞决定及分化的分子机制，生殖细胞的发生、受精机制，以及形态发生过程中的基因调控和细胞间相互作用等问题，也是当今胚胎学最重要的分支学科。从某种意义

上说，发育生物学不仅是现代生命科学的重要基础学科，而且已成为与人类生活密切相关的应用科学。

本书以发育过程为主线、以形态发生为基础，突出人体发育，从当今发育生物学研究领域中的关键和重要问题中选取15个专题，内容既涵盖发育生物学简史、模式动物、受精、胚胎植入、胚胎干细胞、性别决定、信号分子对发育的调控等发育生物学的基础研究问题，又包含了神经系统、免疫系统、内分泌系统、泌尿和生殖系统、消化系统以及心血管系统的形态发育问题，还对胚胎发育与肿瘤、发育生物学相关技术等问题做了介绍。本书可供生命科学与医学专业师生和科研技术人员作为参考，也可供对生命科学感兴趣的非专业读者阅读。

在本书的编写过程中，我们参考了大量国内外《发育生物学》著作，在此向原书作者表示衷心的感谢！尽管我们已尽了很大的努力，但由于发育生物学进展迅速，加之作者水平、能力和学识有限，科普写作的能力不足，有些知识点和内容难免存在不妥和疏漏之处，敬请广大读者批评、斧正。

目录

专题 1

预成论与渐成论之争

——发育生物学简史

我们时常听到这样一句话：人类从哪里来？又要向哪里去？这看起来是一个深奥的哲学问题，然而，这也正是发育生物学要涉猎的问题。发育生物学（developmental biology）既是一门古老的学科，又是一门飞速发展的新兴学科。随着细胞生物学、遗传学、生物化学和分子生物学等生命科学的发展，发育生物学的研究内涵和外延已经大大地扩展了。现代发育生物学是运用先进的生物学技术，研究生物体从配子发生、受精、发育、生长、衰老和死亡等整个生命发生的变化过程及其变化机制的科学。因此，发育生物学是一门研究生物体变化过程的科学，是研究生物体整个生命的发展过程及其调控机制的科学。

发育生物学的历史是人类发展、进步史的缩影。早在公元前 5 世纪，希腊医生希波克拉底（Hippocrates，前 460—前 377）就对鸡的胚胎发育进行了研究，从此开辟了发育生物学的经典时期。本章简要介绍发育生物学发展史中几个有代表性的事件，加深我们对现代发育生物学的理解。

胚胎发育的预成论与渐成论

人类最早对动物胚胎发育的研究始于鸟类。我国古代《埤雅》中有“鸡二十日而化，鹜三十日而化”的记载，说明我国在2000多年前的古代就开始了对鸡鸭孵化时间的研究。然而，真正称得上发育生物学研究鼻祖的是古希腊的希波克拉底。他试图用当时的物理学理论（热、湿和固化的效应）来解释发育的机制，认为身体各部分能产生各种精液，幼体是由各部分精液凝集而成的。希波克拉底首次对鸡胚的发育进行了逐日的观察，并认为人、动物和植物的发育与鸡的发育类似。他还撰写了世界上第一本关于动物学的教科书以及关于发育和生殖方面的论文，对生物体的发生提出了多种可能性：①自发地产生于腐败物，由于当时认为苍蝇和爬虫可能来源于腐败物质；②雌雄同体；③两性生殖；④出芽方式。

1. 胚胎发育的“渐成论”

在希波克拉底后近一个世纪，古希腊哲学家亚里士多德（Macedonian Aristotle，前384—前322）才系统地进行了胚胎发育研究，通过对脊椎动物和无脊椎动物发育的系列观察，他认为，鸡胚的发育是由简单到复杂逐渐形成的，并将其称为渐成论或后成论（epigenesis）。这是朴素的唯物主义观点，但他同时又认为，驱动胚胎发育的内部力量是灵魂，灵魂导致与其相似个体的发生，显然这是唯心主义的观点。尽管如此，亚里士多德关于胚胎发育方面的论断在长达2000年的时间里还是为人们所接受。

2. 胚胎发育的“预成论”

其实，亚里士多德关于胚胎发育是灵魂驱动的观点也是预成论或先成论（pre－formation）的雏形，故他提出的这两种矛盾而对立的观点对于胚胎发育的研究产生了深刻的影响。直到17世纪后叶，随着显微镜的发现，列文虎克（Antoni van Leeuwenhoek，1632—1723）观察到了人类活动的精子，提出了精源说，他认为预成型的雏形人已存在于精子

中，甚至有人声称在精子中也看到了胚胎，出现了一个微型小人(图 1)。在发育时，微型小人只需要伸展开并长大就可以了。另一种持预成论观点的代表人物是胚胎学家马尔比基（Marcello Malpighi，1637—1680）、斯瓦默达姆（Jan Swammerdam）和格拉夫（R. Graaf），他们发现了人类卵巢中的滤泡，对鸡胚进行了仔细的观察，还绘制出了精致的鸡胚图，发现在昆虫的蛹中存在类似蝴蝶状的成虫。因而，他们认为，胚胎预先就已经存在于卵细胞中，发育只不过是继续长大而已。这就是胚胎发生的先成论（pre - formation）。此后，许多著名的生物学家都是渐成论者，包括大名鼎鼎的冯·贝尔（Karl Ernst Von Baer，1792—1876）。他通过比较多种脊椎动物的胚胎发育后，提出所有脊椎动物只有在通过一个非常相似的胚胎期之后才发生发育途径的分化，即著名的冯·贝尔定律。预成论的极端是博内（Ch. Bonnet）的套装学说，该学说认为，在胚胎中存在更小的胚胎，犹如俄罗斯套娃，大胚胎内有小胚胎，小胚胎内有更小的胚胎。预成论观点在 17、18 世纪占据了统治地位，可能与机械论在当时哲学界的主导作用有关。在 18 世纪，先成论与后成论两个学派争论不休。到 19 世纪，细胞学说提出后，预成论才逐渐甘拜下风，甚至销声匿迹，绝大多数胚胎学家认同了渐成论的观点和理念，这一争论才得以解决。



图 1　精子内假想的雏形人
（引自 Browder et al. 1991）

细胞学说丰富了胚胎学理论

渐成论占统治地位后的 100 年时间内，人们对生殖细胞的本质和作用知之甚少。1839 年，德国著名植物学家施莱登（Matthias Jakob Schleiden，1804—1881）和生理学家施旺（Theodor Schwann，1810—

1882）提出了细胞学说，认为所有生物都是由细胞构成的，细胞是生命的最基本单位。这是生物学中最伟大的成就之一，它对正确理解胚胎发育具有重要作用。细胞只能由其他细胞通过分裂产生，因此发育不可能是预成的，必然是逐渐变化的过程，是渐成的。以细胞学的观点来审视胚胎发育，胚胎绝对不是先天就存在的，它是由卵细胞分裂产生的。

20 世纪初，遗传学的发展极大地推动了发育生物学的进步。德国生物学家魏斯曼（August Weismann，1834—1914）堪称发育遗传学的先锋，因为他预见了基因的重要性。他发现动物的细胞可以分为体细胞（somatic cells）和生殖细胞（germ cells），他认为后代的遗传特征不是来自于体细胞，而是来自于生殖细胞（精子和卵子）所携带的遗传特性，生殖细胞并不受体细胞的影响。在动物的一生中，由身体获得的特征不能传递给生殖细胞。就遗传性来说，身体只不过是生殖细胞的载体。

精子和卵子结合形成的细胞称为受精卵（合子），合子经卵裂形成的细胞形成了胚胎。胚胎细胞的核由合子核分裂而来。赫特维希（Oscar Hertwing，1849—1922）对海胆卵的进行了研究后，证明卵在受精后含有两个细胞核，一个属于卵细胞，另一个来自精子，并提出生殖细胞的细胞核携带遗传特性，细胞质与遗传无关。到 19 世纪末，人们发现合子（zygote）的染色体半数来自父亲，半数来自母亲，这就为遗传特性——按孟德尔（Gregor Mendel）规律进行遗传提供了物理基础。体细胞中的染色体之所以在代代相传中保持恒定，是由于在生殖细胞形成时通过减数分裂染色体数目减半，成为单倍体（haploid），受精时，精、卵两个单倍体融合为一个二倍体（diploid）的合子。至此，人们得出结论：受精时，精子和卵子都只为受精卵提供一半的染色体，染色体是携带遗传信息的载体。

遗传学与发育的结合

20 世纪初，胚胎学与遗传学几乎没有发生联系。当 1900 年孟德尔

的遗传规律被重新发现时，人们的兴趣主要集中于遗传机制，特别是遗传与进化的关系上，很少关注遗传与发育的关系。在当时，遗传学主要研究遗传因子是如何从上一代向下一代传递的；而胚胎学是研究个体是如何发育的，尤其是在早期的发育中，细胞是如何分化的。这样看来，遗传学似乎与发育没有关系。

使遗传学与胚胎学联系在一起的一个重要进展是关于基因型（genotype）和表现型（phenotype）理论的提出。1909 年，丹麦生物学家 Wilhelm Johannsen 将生物从父母处获得的遗传特性称为基因型，发育不同时期生物的结构和生化代谢是基因型的具体表现，称为表现型。基因型控制胚胎的发育，它与环境因子一起相互作用影响表现型。同卵双胞胎尽管具有相同的基因型，但随着生长，他（她）们的表现型会出现很大的差别。发育的问题可以认为是基因型与表现型的关系，也就是在发育过程中基因是如何被转录和表达为生物的各种功能的。

遗传学与胚胎学的结合过程是非常缓慢的，在对基因的本质和功能弄清之前几乎没有进展，在 20 世纪 40 年代，基因编码蛋白质的发现是一个转折点。那时，人们已经知道细胞特征是由它所含有的蛋白质决定的，通过控制蛋白质的合成，基因便能控制发育过程中细胞特性和行为的改变。遗传学，尤其是分子生物学与胚胎学的成功结合，赋予了胚胎学新的内涵，对胚胎发育的认识由形态结构深入到细胞与分子水平的发育机制，胚胎学也逐渐发展到了发育生物学。

发育生物学研究的主要问题

发育生物学研究的主要内容是胚胎发育及其生后过程中发生的重要问题，与之相关的一些形态发生及其调节机制的问题有待于深入研究。

1. 以受精过程为中心的问题

生殖细胞的发育　胚胎阶段原始生殖细胞的发生过程及其与生殖质的关系、在生殖腺中雌雄生殖细胞的形成、卵子成熟的调控，以及配子发生过程中的基因表达等因素决定一个细胞变成卵子或精子。

2. 受精的化学因素

关于精子和卵子所释放的配子素，受精过程中精子的变化及其机制、精子和卵子的结合、精子入卵后卵子的变化及其机制、受精后的蛋白质合成、受精卵合子基因的表达及其调控。

3. 发育中的轴与对称问题

（1）胚轴是什么因素促成的，它在发育中的地位是什么？

（2）对称现象是何时决定的？

（3）非对称性发育的机制是什么？

4. 发育早期的问题

（1）胚层的成因。

（2）原肠胚形成过程中的细胞运动和分化、胚层的形成及其调控。

5. 器官形成问题

对于卵子分裂后的细胞，什么因素决定其分化方向；细胞分化和器官原基的形成、胚体雏形的建立、器官原基的继续发育，以及器官发生的基因调节。

6. 环境对发育的影响问题

（1）环境对发育所起作用的重要性如何。

（2）哺乳动物囊胚和子宫的相互作用，以及胚胎植入子宫内膜及其调节。

7. 分化的机制

发育过程中胚胎细胞的分化是发育生物学研究的重点内容。细胞分化既有外部的因素又有内在的因素在起作用。外部因素和内在因素如何指导胚胎细胞差异的基因表达是分化的关键。

8. 胚胎干细胞

哺乳动物胚胎干细胞研究是近年来兴起的一个热门研究课题，包括胚胎干细胞的培养、利用胚胎干细胞进行动物的克隆，以及组织和器官的培养等。

9. 再生问题

（1）是什么刺激使涡虫、蝾螈、鸟类和柱头虫等动物的成体的细胞发生新的结构？

(2) 为何人类和有些动物的多数器官不能再生?

上述问题有些已能解答或部分解答，但多数尚待进一步探讨。

(张金山)

参考文献

[1] 安利国. 发育生物学. 北京：科学出版社，2010

[2] 王方海. 发育生物学. 广州：中山大学出版社，2011

[3] 王秋，吕连升，姚纪花. 发育生物学引论. 北京：科学出版社，2008

[4] 尤永隆，林丹军，张彦定. 发育生物学. 北京：科学出版社，2011

[5] 王玉凤. 发育生物学. 北京：科学出版社，2011

[6] 张远强. 发育生物学. 北京：人民卫生出版社，2007

[7] 樊启利，白书农. 发育生物学原理. 北京：高等教育出版社，2002

[8] 桂建芳，易梅生. 发育生物学. 北京：科学出版社，2002

[9] 张红卫. 发育生物学. 2 版. 北京：高等教育出版社，2006

[10] Arias AM, Stewart A. Molecular principles of animal development. Oxford: Oxford University Press, 2002

[11] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryomicroinjection of zinc-finger nucleases. Science, 2009, 325 (5939): 433 - 433

[12] Meng XD, Noyes MB, Zhu LJ, et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc - finger nucleases. Nature Biotechnology, 2008, 26 (6): 695 - 701

[13] Niu YY, Yu Y, Bernat A, et al. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early - cleavage - stage embryos using a simian immunodeficiency virus - based vector. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America, 2010, 107 (41): 17663 - 17667

[14] Tong C, Li P, Wu NL, et al. Production of p53 gene knockout rat by homologous recombination in embryonic stem cells. Nature, 2010, 467 (731): 211 - 213

[15] Wolpert L. Principles of Development. Oxford: Oxford University Press, 2007

[16] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblast to induced pluripotent stem Cells. Nature, 2009, 458 (7239): 766 - 770

专题2

舍生取义

——发育研究的模式生物

生命的多样性是进化的产物，现今的差异是由于亿万年来的遗传变化，特别是那些控制胚胎发育基因的变化累加的结果。因此才有了如今所说的分类单元（taxon）、同源性（homology）和共同祖先（common ancestry）的概念。在发育生物学和遗传学的研究中，理想的研究系统和物种是学科发展的关键问题之一。有些物种可以长期、反复作为研究材料，而且从这些物种研究中得出的许多生命活动规律可代表许多物种共同的规律，这种生物物种就是模式生物。

许多重大的研究突破往往与模式生物相关。比如19世纪后期胚胎学家观察海胆（seaurchin），使我们现在熟悉了精子和卵子以及精卵受精这一重大发育生物学问题；当爱德华·刘易斯（Edward B. Lewis）、克里斯蒂安·尼斯莱因·福尔哈德（Christiane Nusslein－Volhard）和埃里克·维绍斯（Eric. F. Wieschaus）分享1995年诺贝尔生理学或医学奖时，他们不会忘记关于早期胚胎发育基因调控的重大发现是基于基因学说的创建者托马斯·亨特·摩尔根（Thomas Hunt Morgan）选用的果蝇这一近乎完美的模式生物；线虫永远不会想到因为它们被作为研究对象，才使西德尼·布伦纳（Sidney Brenner）、约翰·苏尔斯顿（John E.

Sulston）和罗伯特·霍维茨（Robert H. Horvitz）发现了凋亡现象及其机制，从而获得2002年诺贝尔生理学或医学奖；在20世纪中叶英国发育生物学家约翰·格登（John Gurdon）用爪蟾（Xenopus）进行有关体细胞核移植的基础上，克隆羊、克隆牛和克隆鼠的诞生及体细胞克隆技术于20世纪90年代日臻成熟。特别是20世纪90年代分子发育生物学兴起后，使得模式生物显得更为重要，而正是因为有了模式生物的“舍生取义”，才使得科学家们能逐步深入了解地球上如此之多生命种类的起源和发育的来龙去脉及其相互关系。目前常用的模式生物主要包括逆转录病毒（retrovirus）、大肠杆菌（escherichia coli）、酵母（budding yeast）、海胆、秀丽隐杆线虫（caenorhabditis elegans，华美广杆线虫）、果蝇（drosophila melanogaster）、爪蟾、斑马鱼（danio rerio，zebrafish）、小鼠（mus musculus，mouse）、拟南芥（arabidopsis）和水稻（rice）等等，几乎涵盖了目前地球上发现的所有生命种类。这些物种究竟是怎样入选模式生物的？作为模式生物它们各自具有什么样的特点？

本章将着重介绍几种发育生物学研究中常用的模式生物。

秀丽隐杆线虫

1. 秀丽隐杆线虫的分类地位

秀丽线虫长约1mm，隶属于线形动物门线虫纲小杆线虫目广杆线虫属。线虫中的蛔虫、钩虫和蛲虫与人类生活密切相关，而华美广杆线虫是生活于土壤中并以细菌为食的一种自由线虫（图2）。

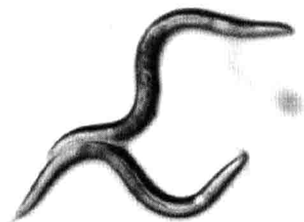


图2 秀丽隐杆线虫

2. 秀丽隐杆线虫作为模式生物的缘由

20世纪70年代初，在做分子遗传学研究时，布伦纳等发现若用该线虫作为模式生物，将有可能鉴定参与发育调控的每一个基因及追踪每一个单细胞的谱系，因此逐步确立了其模式

生物的地位。作为第一个基因被完整测序的多细胞生物，该线虫还具备以下优点：

胚胎发育仅 12 ~ 18 小时，生命周期短，只有 3.5 天左右。由于该线虫以细菌为食，可先让琼脂培养皿长满细菌，再接种。线虫还可以在冰箱里冷冻储存，复苏之后可继续研究。体细胞数量少且透明可见，易于追踪细胞分裂谱系。细胞谱系分析通过记录特定细胞在胚胎发育中的分裂历史，来揭示其特定的细胞发育命运，并观察其发育潜能。线虫胚胎发育的细胞分裂为不对称分裂，种系（germ line）细胞中的种质颗粒（germ line granule）在细胞分裂过程中仅分配到形成种系细胞的细胞质中。种系细胞分裂后形成子代分化细胞和子代种系细胞，前者开始分化，后者再次分裂成子代种系细胞和子代分化细胞，而种系细胞经过一系列分裂后最终分化为生殖细胞。因此我们今天能观察线虫机体里每一个细胞的分化去向。

此外，秀丽隐杆线虫存在雌雄同体（hermaphrodite）和雄性两类不同生物型。在雌雄同体生物型中，每尾线虫既含有卵子又含有精子，精卵在体内受精，胚胎在生殖腺管内发育，幼虫由阴门产出。雌雄同体个体自体受精的结果可产生非常纯合的基因型。雌雄同体个体性别决定的染色体机制为 XX 型，在偶然情况下，可产生大约 0.2% 的 XO 雄性个性。XO 雄性个体可与雌雄同体个体交配产生后代，从而增加基因重组和新等位基因引入的机会。如果把线虫浸泡到含有核酸的溶液中，还可以用这种最简单的方式实现基因导入。

果　蝇

1. 果蝇的两个重大贡献

自 1910 年摩尔根发现第一个突变体白眼果蝇以来，果蝇作为模式生物已有一个世纪左右（图 3）。正是以它为模式生物，摩尔根及其学生才从有关性连锁（sex linkage）、性染色体、多线染色体和伴性遗传等遗传规律的发现中提出了基因论，奠定了现代遗传学的基础，并由此

于 1933 年获得了诺贝尔奖。

1978 年，美国加州理工学院刘易斯在研究果蝇遗传和发育时，发现了控制体节发育的基因复合体。后来，克里斯蒂安和埃里克等采用饱和诱变的方法随机破坏近一半的果蝇基因，然后通过显微观察来研究和分析影响体轴形成和分节模式的基因，并由此鉴定出 15 种不同的由于突变引起体节缺陷的基因。后来的研究证明，这套基因普遍存在于从昆虫到人的基因组中，是决定机体左右对称布局形成的最基本元素。1995 年的诺贝尔生理学或医学奖则由他们三人分享。



图 3　果蝇

2. **果蝇的分类地位**

果蝇的分类地位归属于节肢动物门昆虫纲双翅目果蝇科果蝇属，其学名全称为黑腹果蝇（drosophila melanogaster meigen）。在自然界果蝇一般以腐烂的果实为食。

3. **果蝇作为模式生物的缘由**

果蝇的生命周期短，在实验室条件下，2 周就可完成一次世代交替。成虫个体仅为 2mm，容易饲养。成虫产出的受精卵只经 1 天的胚胎发育就孵化出幼虫，幼虫经历蜕皮和成蛹，孵出成虫。成虫大约可存活 9 天，但在孵出后在半天内即可交配产卵，且产出的卵子大，易于观察。

只有 4 对染色体，且唾液腺细胞中含有巨大的多线染色体（polytenic chromosome）。具有几十个易于诱变分析的遗传特征，并保持有大量的突变体。

胚胎发育速度快，前 13 次卵裂每次只间隔 9 分钟，细胞核成倍增加成为一个合胞体（syncytium），其胚胎发育过程是观察分析卵裂、早期胚胎发生和躯体模式形成等发育调控机制的绝佳材料。幼虫存在变态过程，是分析器官芽（imaginal disc）细胞增殖机制的理想模型。

斑马鱼

1. 斑马鱼的分类地位及作为模式生物的起因

斑马鱼属于脊索动物门脊椎动物亚门硬骨鱼纲辐鳍亚纲真骨鱼总目鲤形目鲤科短担尼鱼属（图4）。20世纪90年代，在脊椎动物中还没有找到理想的模式生物。小鼠虽有饲养容易、繁殖迅速等优点，但因其是胎生而难以直接观察后代。直到20世纪末，几千个斑马鱼的突变体被逐渐筛选出来，第一个斑马鱼基因连锁图得以发表，从而使其具备作为脊椎动物分子发育生物学，甚至人类基因组计划研究的动物模型。



图4　斑马鱼

2. 斑马鱼作为模式生物的缘由

繁育力强，体外产卵、体外受精且胚体透明。不仅能跟踪观察每一个细胞的发育命运，而且也可观察到像原肠期的细胞运动、脑区的形成和心跳等。成体长3～4cm，孵出后约3个月可达性成熟，饲养成本小。

精子可通过冷冻来保存，成熟的雌鱼每隔一周可产几百粒卵子，卵子体外受精，体外发育，胚胎们同步发育且发育速度快，25℃～31℃发育正常。

脊椎动物二倍体基因组分析的耗时性是困扰发育生物学和遗传学研究的主要难题之一。目前，可用紫外线照射失活的精子使卵子受精，并诱导单倍体发育，单倍体胚胎可发育出基本的体型，但也会有短尾、脊椎弯曲或水肿等多种畸形，并在受精后4天左右死亡。用紫外线照射失活的精子与卵子受精后，再采用静水压休克（hydrostatic pressure shock）或热休克（heat shock）诱导第二极体保留或抑制第一次卵裂的方法，可获得杂合的或纯合的雌核发育二倍体，这样，一些隐性突变三代以内就可得到鉴定。由于斑马鱼繁育一代仅需3个月左右，因而大大缩短了

时间。

3. **斑马鱼作为模式生物的应用**

（1）果蝇式的人工突变途径——饱和诱变　饱和诱变的基本原理是用化学诱变剂处理成熟的雄性个体，然后将其诱变了的精子与卵子受精，产生的个体通过三代繁育来筛选发育异常的胚胎，这必须呈现大量的动物个体才能得到筛选。而斑马鱼卵子体外受精和胚胎体外发育的生殖特征使其成为饱和诱变的理想物种。

（2）小鼠式的遗传操作特点——基因转移　在发现了一种拟形的还原病毒载体能有效感染培养的鱼类细胞的基础上，美国学者将这种病毒注射到51个斑马的囊胚期胚胎中，发现8尾鱼已将这一原病毒的DNA传给了下一代，并按孟德尔方式遗传。

（3）基因连锁图的构建——基因克隆定位　约翰·波斯尔思韦特（John H. Postlethwait）等依据在植物基因组分析中发展起来的随即扩增多态性DNA（randomly amplified polymorphic DNA，RAPD）等方法，利用斑马鱼可进行单倍体和二倍体雌核发育的有利条件，以斑马鱼的两个品系，构建了斑马鱼基因组的第一个连锁图，并已将一隐性的色素突变基因（黄铜色）定位到了连锁图上。

目前，斑马鱼的细胞标记技术、组织移植技术、突变技术、单倍体育种技术、转基因技术、基因活性抑制技术等已经成熟，且有数以千计的斑马鱼胚胎突变体，是研究胚胎发育分子机制的优良资源，有的还可作为人类疾病模型。

爪　蟾

1. **爪蟾的分类地位及其贡献**

爪蟾的全称为光滑蟾（xenopus laevis），又名非洲爪蟾，属于脊椎动物两栖纲无尾目负子蟾科爪蟾属（图5）。由于是脊椎动物，与人类及其他脊椎动物具有更为密切的关系，其发育模型及调控机制与人类更相似，且具有较大的、易于观察分析的卵子，因而有关脊椎动物的许多

发育学原理和知识如卵子的发生、受精激活、卵裂、卵裂与中囊胚转换、体轴决定、原肠形成、器官发生、核移植、胚胎分割和诱导实验、细胞核的多能性（pluripotency）与体细胞克隆，以及参与调节哺乳动物卵母细胞减数分裂的重要蛋白激酶等，都是以爪蟾等为研究对象完成的。

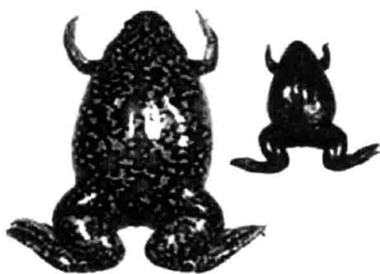


图5 爪蟾

2. **爪蟾作为模式生物的缘由**

爪蟾生活在水中，成体约长7cm，易于在实验室人工养殖，特别是通过注射促性腺激素，可以诱导其在任何时候产卵。

爪蟾的卵子较大，直径为1～2mm，且在体外受精、体外发育，可在实验室进行显微操作等实验。

发育早期通过辐射状完全卵裂产生囊胚。其透明的卵壳可以采用物理或化学方法脱去，从胚胎上切下来的细胞团可以依靠细胞中的卵黄提供营养，在无菌的生理盐水中继续发育。

3. **热带爪蟾：光滑爪蟾的理想替身**

染色体和核型分析证明，具有36个染色体的光滑爪蟾的基因组发生了重复加倍，因而在这一模式动物中不可能进行类似于在果蝇、线虫和小鼠中进行的通过干扰一个基因功能或者剔除一个基因而观察到什么错误的遗传分析研究。热带爪蟾（xenopus tropicalis）现已成为替代光滑爪蟾的理想模型，其优势还有：

个体小，世代周期一般为4～6个月，比光滑爪蟾（1～2年）短得多，且还可进一步缩短。每次排卵仍能排出1000～3000粒卵子，其胚胎（0.7～0.8mm）虽小但不妨碍进行精细的胚胎操作。

热带爪蟾是爪蟾属下基因组最小且唯一的二倍体两栖动物。将外源DNA在体外整合到分离的精核中再注射到未受精卵中，能短时间内产生大量转基因胚胎，这些胚胎不是嵌合体，无需经过多代繁育去寻找和建立转基因纯系。

由于热带爪蟾是光滑爪蟾的亲缘种，两种物种间许多基因高度保

守，因而有关光滑爪蟾的研究资料可以直接应用于热带爪蟾。

小　鼠

1. 小鼠的分类地位及实验小鼠的发展

小鼠属于哺乳纲啮齿目鼠科小鼠属，由于其易于繁殖和饲养，具有较为价廉和方便操作的优点，从20世纪初开始，随着遗传学、胚胎学、营养学、发育生物学和生物医学的兴起，小鼠作为实验动物得到广泛的应用和发展。目前可根据实验要求选择不同品系或同胎小鼠做实验，也可选择同一品种（或品系）、同年龄、同体重、同性别的小鼠做实验，由于动物遗传均一，个体差异小，实验结果精确可靠。按遗传学的划分标准，现今保持和使用的实验小鼠可分为远交群（outbred stock）、近交系（inbred strain）和同源基因导入系（congenic strain）等。远交群是那些为了保持群体内相对稳定的遗传多样性而通过随机交配所获得的繁育群体。近交系是那些连续进行20代以上的兄弟与姐妹交配所获得的具有相同遗传背景的近交群体或具有同等遗传相似性的人工繁育群体。同源基因导入系是指通过一系列回交方法把一个突变基因导入到一个近交系而形成的人工繁育群体（图6）。



图6　小鼠

2. 小鼠作为发育生物学研究模型的缘由

哺乳动物的胚胎发育机制不但要比脊椎动物复杂得多，而且其研究过程也比脊椎动物困难得多，且胚胎不易在实验室做较长时间保存。小鼠就是因为快速繁衍且多产仔等优势，成为发育生物学研究的理想模型。

性情温顺，胆小怕惊，对外来刺激极为敏感。对于多种毒素和病原

体具有易感性且反应非常灵敏，如百万分之一的破伤风毒素能使小鼠死亡。对致癌物质也很敏感，自发性肿瘤多。

繁殖不受季节影响。出生后6周的小鼠达到性成熟，每4天排卵一次，每次排出8~12个已排出第一极体、完成了第一次减数分裂的成熟卵子。一旦受精，卵子就很快排出第二极体，完成第二次减数分裂。从交配受精开始，一般需经19~20天的发育而产生胎儿，因而为受精卵和着床前囊胚的获得、转基因技术的应用、突变体的稳定与增殖等提供了充裕的材料。

小鼠的基因与人的基因非常相似。目前在小鼠中已完成了父系和母系的基因组印记、具有黑白两种皮毛的嵌合体小鼠和由畸胎瘤细胞植入融合后产生的嵌合体小鼠等著名的发育生物学实验，特别是那些经转基因所获得的含有不同基因的小鼠及经基因剔除（gene knockout）所产生的各种各样的基因缺陷型小鼠的不断产生，为现代分子发育生物学研究出现重大突破提供了可能。

（周劲松）

参考文献

[1] 王凯. 生命科学研究中常用模式生物. 生命科学研究，2010，14（2）：156-165

[2] 张红卫. 发育生物学. 2版. 北京：高等教育出版社，2010

[3] Marsh EK, May RC. Caenorhabditis elegans, a model organism for investigating immunity. Appl Environ Microbiol, 2012, 78（7）：2075-2081

[4] Chiu-Ying Peng, Chun-Hao Chen, Jiun-Min Hsu, et al. C. elegans model for neuronal aging. Communicative & Integrative Biology, 2011, 4（6）：696-698

[5] Ewbank JJ, Zugasti O. C. elegans: model host and tool for antimicrobial drug discovery. Dis Model Mech, 2011, 4（3）：300-304

[6] Kaun KR, Devineni AV, Heberlein U. Drosophila melanogaster as a model to study drug addiction. Hum Genet, 2012, 131（6）：959-975

[7] Hirsch HV, Lnenicka G, Possidente D, et al. Drosophila melanogaster as a model for lead neurotoxicology and toxicogenomics research. Front Genet, 2012, 3: 68

[8] Liu S, Leach SD. Zebrafish models for cancer. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 71-93

[9] Jao LE, Appel B, Wente SR. A zebrafish model of lethal congenital contracture syndrome 1 reveals Gle1 function in spinal neural precursor survival and motor axon arborization. Development, 2012, 139 (7): 1316 - 1326

[10] Stephen A. Renshaw, Nikolaus S. Trede. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity (Review). Dis. Model. Mech, 2012, 5 (1): 38 - 47

[11] Straka H, Simmers J. Xenopus laevis: An ideal experimental model for studying the developmental dynamics of neural network assembly and sensory - motor computations. Dev Neurobiol, 2012, 72: 649 - 663

[12] Feng L, Milner DJ, Xia C, et al. Xenopus laevis as a novel model to study long bone critical - size defect repair by growth factor - mediated regeneration. Tissue Eng, 2011, 17: 5 - 6

[13] Nakaoka H, Nishiyama A, Saito M, et al. Xenopus laevis Ctc1 - Stn1 - Ten1 (xCST) protein complex is involved in priming DNA synthesis on single - stranded DNA template in Xenopus egg extract. J Biol Chem, 2012, 287 (1): 619 - 627

[14] Kawauchi D, Robinson G, Uziel T, et al. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. Cancer Cell, 2012, 21 (2): 168 - 180

[15] Peter L Oliver, Melanie V Sobczyk, Elizabeth S, et al. Disrupted Circadian Rhythms in a Mouse Model of Schizophrenia. Current Biology, 2012, 22 (4): 314 - 319

专题3

生命之初

——受精

天真的孩子常会问父母："我是从哪里来的?"有人在新浪微博上提出这个问题，引起数千网友晒身世：来自"垃圾桶"、来自"买奶粉或充话费附送"……这些都是年轻父母口中不经意的笑谈。其实，在动物物种的命脉传承中，绝大多数高等动物是以受精作为新生命起点的。

精子和卵子的结构

1. 受精现象的发现

17世纪中叶，显微镜的发明使人们认识了精子和卵子。由此引出了生命发生的"精源说"和"卵源说"，幻想有一个大头胎儿蹲在精子或者卵子内，雏形人增大后变为胚胎，学说的争鸣和学者有效的工作逐渐揭开新生命起点神秘的面纱。1875年，德国动物学家赫特维希（Hertwig）发现了海胆精子入卵后雌雄原核融合的现象，提出精子和卵子结合的理论，指出生殖细胞核是主要的遗传物质。第二年，Hermann

Fol凭着极大的毅力，观察到海胆精子进入卵子的真实过程，完全证实了雄性核与雌性核互相融合而形成新生命。至此，人们开始真正认识新生命的起点——受精。

受精指的是单倍体的精子和卵子经过一系列的相互作用，结合和融合而形成二倍体受精卵的过程。受精决定了性别，维持了物种稳定性。重新组合的遗传物质，使新个体具有与亲代不完全相同的性状。

2. 精子的结构

精子在睾丸生精上皮内发生，二倍体的精原细胞经过二次减数分裂，形成单倍体的圆形精子细胞，圆形精子细胞经过一系列的变形过程，成为蝌蚪形的精子。完整的精子包括头、尾两个部分。精子的头部为浓缩的核，是其遗传物质之所在。核的前端包裹着含有多种水解酶的顶体。尾部为精子的运动装置，大多数动物的精子依靠尾部或鞭毛波浪式的摆动，推动精子在水或雌性动物的生殖道中移动。鞭毛具有特殊的结构，轴纤丝是鞭毛中起推动作用的主要部分。生精小管产生的精子不具备运动和受精的能力，需要在附睾内成熟。

3. 卵子的结构

雌性动物的生殖干细胞——卵原细胞，在出生前就停止增殖，并且大部分退化，只留下小部分逐步分化为初级卵母细胞并停滞于第一次减数分裂的前期，至出生时，卵巢内就没有卵原细胞了，只有初级卵母细胞。初级卵母细胞被一层扁平卵泡细胞包绕，两者合称原始卵泡。卵子在卵巢内历经原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡而成熟，排卵后由输卵管伞捕获。排卵前，初级卵母细胞完成第一次减数分裂，遗传物质均等地进入两个细胞，但胞质分配不均等，只形成一个次级卵母细胞，它保留了绝大部分的胞质，迅速进入第二次成熟分裂，并停滞于第二次减数分裂的中期；另一个细胞为体积很小的第一极体，很快退化消失。排出的卵子包括位于卵泡中央卵丘内的次级卵母细胞和周边由卵泡细胞组成的放射冠，在两者之间为均质的透明带。

精卵相遇和识别

1. **精子运动的激活**

1951年，“试管婴儿”奠基人、美籍华裔科学家张民觉在雌兔排卵前和排卵后的不同时间，将雄兔精液置于雌兔输卵管中，发现只有在排卵前6小时置入输卵管内的精液才能使卵子受精。由此提出精子必须在雌性动物生殖道内获能的理论。所谓获能是指精子获得穿透卵子透明带的能力。

成熟精子是终分化的特殊细胞，无法合成新的蛋白质。获能主要通过蛋白质的磷酸化来完成。目前认为，蛋白酪氨酸磷酸化在获能中起到极其重要的作用，主要受到三种信号通路的调节，即PKA信号通路、受体酪氨酸激酶通路和非受体蛋白酪氨酸激酶通路，其中cAMP/PKA信号通路最为重要。获能后，精子的本质形态虽然没有发生显著变化，但生理功能上变化显著。首先表现在质膜上，获能去除了在雄性生殖道内精子表面吸附的某些成分，其表面糖基得到修饰。其次，代谢活性明显增强，耗氧量增加。再次，精子尾部运动幅度增大，呈现一种超激活运动状态。形象地讲，获能的精子就像剃掉了胡须、穿上了西装、振奋了精神、舒展了手脚的男士。当精子到达输卵管的壶腹部，与卵子相遇，生命之门悄然开启 。

2. **精子和卵子的识别**

精卵识别发生在获能精子质膜上特异性的卵子结合蛋白与卵子透明带ZP_3蛋白的寡糖之间，两者形成受体-配体复合物，使精子附着在透明带上。在一个卵子的周围可以附着数十个甚至上百个精子。顶体反应是精卵识别诱发的另一结果。顶体反应时，精子质膜与顶体外膜发生融合，释放出顶体内的多种酶类。

透明带的主要成分为糖蛋白，人、小鼠、大鼠、兔、马等的透明带由3种糖蛋白组成，分别编为ZP_1、ZP_2、ZP_3，这些蛋白分子在细胞内合成后以小泡运输至细胞膜，并以胞吐方式分泌到细胞外。它们在受精

过程中的作用主要通过对小鼠的研究而获得，一般认为 ZP_1 主要起支架作用，把 ZP_2、ZP_3 连接起来；ZP_3 上有初级精子受体，介导了顶体完整的精子与透明带之间的初级识别，初级精子受体与精子质膜表面的初级卵子结合蛋白特异性结合，诱导了精子顶体反应的发生，因此 ZP_3 是诱导精子顶体反应的主要物质；ZP_2 上则分布着次级精子受体，与已经发生了顶体反应的精子发生次级识别，次级精子受体与位于精子顶体内膜的次级卵子结合蛋白结合，在精子穿越透明带的过程中起作用。顶体反应使精子发生一系列变化并迅速穿越透明带到达卵母细胞表面。

精子入卵的调控

1. 精卵质膜融合

到达卵母细胞表面的精子同卵母细胞的微绒毛识别，然后精子赤道段的质膜同卵质膜融合，随着卵质膜的抬高，精卵质膜完全融合，精子核进入卵母细胞内。精卵质膜的识别和融合离不开“红娘”的牵线。研究显示，担任“红娘”的分子包括精子表面的来源于附睾的吸附蛋白 DE、精子质膜表面蛋白 PH20、受精素家族成员、Izumo，以及卵子表面四跨膜素家族成员 CD9、CD81、整合素、GPi 锚定蛋白等。以 Izumo（*Nature* 杂志，2005）为例，该分子是免疫球蛋白超家族成员。敲除 Izumo 的小鼠能产生表面正常的精子，并完成顶体反应，但不能与卵母细胞融合，而通过单精子胞质内注射使敲除 Izumo 的精子绕过融合过程直接进入胞质中，此时受精卵可发育为正常健康个体。这说明 Izumo 在精卵质膜融合中具有重要作用。

2. 多精受精阻断的机制

受精过程环环相扣，任何一个错误均可导致受精的失败。虽然正常男性一次可以排放超过 3 亿的精子，到达卵子表面的也有数百个，但仅有一个精子进入卵母细胞而完成受精。这是为什么呢？研究发现，这完全依赖卵子的多精受精阻断机制。所谓多精受精，指的是在受精过程中有两个或者两个以上的精子进入同一个卵母细胞。常导致胚胎发育异常

或阻滞，最终自然流产而夭折。

在海胆中，多精受精的阻断发生在精卵结合后的 1 ~ 3 秒，此时受精卵的膜电位由 -70mV 快速去极化并达到正电位。这种电位变化可以迅速阻断正在穿越透明带的精子继续进入。但是在哺乳动物中，没有观察到膜电位变化引起的快速阻止机制。

目前的研究表明，哺乳动物参与多精受精阻断的是卵子所特有的一种细胞器——皮质颗粒。它位于卵母细胞质膜下方，由单位膜包括多种酶类构成。在精卵细胞质膜融合之际，皮质颗粒内的酶类，以爆发式的胞吐方式迅速释放至卵周隙，该过程又叫作皮质反应。皮质反应后，颗粒内含物在卵周隙内可持续存在至胚胎 8 细胞期。皮质反应的启动与磷脂酰肌醇信号通路有着密切的联系。二磷酸磷脂酰肌醇水解产生的 DAG 激活 PKC，导致皮质颗粒膜与卵质膜融合；IP3 使细胞内钙库释放 Ca^{2+}，一方面诱导卵母细胞继续第二次减数分裂，另一方面促进了皮质反应的发生。释放至卵周隙的皮质颗粒中的酶，迅速改变了透明带的性质，这种改变又被称作透明带反应。具体表现在，ZP_3 被皮质颗粒中的糖苷酶所灭活，其他精子无法同透明带识别。蛋白酶的作用下，透明带水解变硬，阻止已经部分穿越透明带的精子的进一步穿透。透明带反应是哺乳动物多精受精的直接阻断因素。

卵子代谢的激活

卵子受精之前，代谢水平很低，无 DNA 的合成活动，RNA 和蛋白质的合成都极少。因此排出的卵子，如果未受精，很快就夭折。如同“王子的亲吻唤醒了沉睡中的公主”，精卵质膜的融合激活了停留于第二次减数分裂中期的次级卵母细胞，卵子的代谢速率迅速提高，并开始合成 DNA。第二次减数分裂完成后，雌原核形成。与此同时，精子核去致密化，形成雄原核。雌雄原核相遇，迅速融合，受精卵形成。卵母细胞的激活在受精过程中十分关键，有关卵子激活的详细机制目前还不清楚，只知精子仅起到了打开程序开关的作用。

2008 年 4 月，*Science* 杂志生殖细胞专栏中的撰文指出了卵母细胞转变为受精卵时的各种变化及其精细的调节。

1. 精卵细胞膜在接触处融合，通过由精子注入卵子的一种激活因子建立了一条通道。接着，精子的细胞核、中心粒和线粒体通过这条通道直接进入卵子中。

2. 在精子接触点上，磷脂酰肌醇（PI）信号传导通路被启动，数秒钟内产生第二信使三磷酸肌醇（IP3）和二酰甘油（DAG）。其他第二信使如环鸟苷酸（cGMP）和环腺苷二磷酸－核糖（cyclic ADP－ribose）可瞬间出现。因为受精是发育的一个必不可少的前提，可能存在许多的机制以保证信号转导和卵子激活。

3. 第二信使 IP3 和环腺苷二磷酸－核糖或精子提供的激活因子，导致 Ca^{2+} 从内质网（ER）中释放到胞浆中。正反馈回路导致游离钙猛增：Ca^{2+} 释放引起邻近 ER 中 Ca^{2+} 的进一步释放。储存在 ER 中的 Ca^{2+} 分别作为独立的分隔成分起作用。从第一个分隔体释放的 Ca^{2+} 刺激第二个分隔体中 Ca^{2+} 的释放，依次类推。Ca^{2+} 释放的过程爆发性的传播至整个卵子。因为被释放的 Ca^{2+} 很快被泵回 ER 中，所以一个 Ca^{2+} 波总能以循环的、增殖的形式从精子进入点开始，最后穿越至卵子对极。在豚鼠和小鼠中，第一个 Ca^{2+} 波出现后接着一串钙振荡；反复出现的 Ca^{2+} 波每隔 1～10 分钟发生一次。

4. Ca^{2+} 信号刺激卵子的新陈代谢活动（metabolic activation），这种代谢活动也受 DAG 调控，尽管它存在于卵膜内。一种蛋白激酶 C（PKC）从胞浆中转移到膜上与 DAG 联系并被激活，然后，PKC 通过把磷酸盐转变成反向转运（antiporter）的丝氨酸和苏氨酸残基来刺激卵膜上的 Na^+/H^+ 反向转运。通过这种离子交换，H^+ 被排出细胞外，Na^+ 被摄取进来，卵内胞浆中 pH 值升高。目前的假说认为，离子交换和 pH 值升高创造了使储存在核糖核蛋白（ribonucleoprotein，RNP）颗粒中的 mRNA 释放和转译的条件。新生成的蛋白质中有多种组蛋白（histone），它是卵裂过程中染色体复制所必需的物质。

5. 另一连串事件的发生从激活 PKC 开始，最后导致 DNA 复制（DNA replication）的启动。DNA 复制在单倍体的精、卵细胞核中开始，

至两核相遇融合前完成。在哺乳动物中，雌原核在与雄原核融合前首先必须完成第二次减数分裂。第二极体的排出是减数分裂完成的标志。随着雌、雄原核相遇和融合，受精结束。

紧接着第一次卵裂开始。生命的辉煌皆来自起点的精彩。

（李　臻）

参考文献

[1] 黄品秀，韦继红. 受精调控机制的研究进展. 中华妇幼临床医学杂志（电子版），2014，10（1）：116－119

[2] 李路，刘继红. 弱精子症患者精子中电压依赖性钙通道基因表达的变化. 中华男科学，2007，13（8）：706－709

[3] Feng HL, Hershlag A, Han YB, et al. Localizations of intracellular calcium and Ca^{2+}－ATPase in hamster spermatogenic cells and spermatozoa. Microsc Res Tech，2006，69（8）：618－623

[4] Chan HC, Wu WL, Sun YP, et al. Expression of sperm Ca^{2+}－activated K^{+} channels in xenopus oocytes and their modulation by extracellular ATP. FEBS Lett, 1998 Nov 6, 438（3）：177－182

[5] Gadella BM. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. Reprod Fertil Dev, 2012, 25（1）：26－37

[6] Chiu PC, Wong BS, Lee CL, et al. Zona pellucida－induced acrosome reaction in human spermatozoa is potentiated by glycodelin－a via down－regulation of extracellular signal－regulated kinases and up－regulation of zona pellucida－induced calcium influx. Hum Reprod, 2010，25（11）：2721－2733

[7] Jaldety Y, Glick Y, Orr－Urtreger A, et al. Sperm epidermal growth factor receptor（EGFR）mediates α7 acetylcholine receptor（AChR）activation to promote fertilization. J Biol Chem, 2012, 287（26）：22328－22340

[8] Cardona－Maya W, Velilla PA, Montoya CJ, et al. In vitro human immunodeficiency virus and sperm cell interaction mediated by the mannose receptor. J Reprod Immunol, 2011, 92（1－2）：1－7

[9] Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, et al. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. Mol Reprod Dev, 2008，75（1）：150－155

[10] Marin－Briggiler CI, Gonzalez－Echeverría F, Buffone M, et al. Calcium requirements

for human sperm function in vitro. Fertil Steril, 2003 , 79 (6): 1396 - 1403

[11] Triphan X, Menzel VA, Petrunkina AM, et al. Localisation and function of voltage - dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. Pflugers Arch, 2008, 455 (4): 677 - 686

[12] Escoffier J, Boisseau S, Serres C, et al. Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca (V) 3. 1 and Ca (V) 3. 2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca (V) 3. 1 and Ca (V) 3. 2 deficient mice. J Cell Physiol, 2007, 212 (3): 753 - 763

[13] Sutton KA, Jungnickel MK, Wang Y, et al. Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. Dev Biol, 2004, 274 (2): 426 - 435

[14] Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, et al. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. Biol Open, 2012, 1 (7): 640 - 647

专题4

种子与土壤

——胚泡植入

一颗鸡蛋可以直接孵出一只小鸡，一粒鱼卵可以直接孵出一条小鱼，甚至一头恐龙也可以从远古的恐龙蛋里破壳而出。但是，一颗种子要长成参天大树，就必须扎根于土壤；胎生的动物，包括人，要从一个受精卵发育为一个新生命，就必须从母体获得充足的营养，而子宫就宛如土壤之于种子，为其提供广阔的空间与源源不断的养料，使微小的一个细胞发育为一个呱呱落地的婴儿。生命的种子——受精卵要扎根于生命的土壤——子宫，其中的关键步骤就是胚泡植入。试管婴儿技术可以帮助一些有生育问题的男女得到自己的小宝宝，但是，小宝宝可不是在试管里出生的，要经过胚泡植入，在妈妈的子宫里才能长大。

植入是生殖过程中的重要环节，是妊娠的关键。植入包括胚泡在子宫内膜上的迁移、定位、黏附、侵入以及子宫内膜的蜕膜化反应等，以及随后子宫内膜的修复。植入需要有接受态的内膜和功能正常的胚泡，以及两者之间的相互识别。胚泡植入的调控机制十分复杂，研究表明，这一过程是由子宫局部激素-免疫-细胞因子及黏附分子网络系统相互协同或拮抗的结果。子宫内膜容受性受多种因素调控，卵巢甾体激素（E2/P4）充当起始信号，细胞因子、生长因子充当中介信号，黏附分

子介导细胞－细胞、细胞－基质间的黏附。

简单来说，植入是指胚泡植入子宫内膜。这一过程包括一系列细胞、分子信号传递过程。成功的植入取决于胚泡的发育状况和子宫内膜容受性，两者的同步发育、互相配合起决定作用。让我们一起来探索其中的奥秘吧！

植入的时间：窗口期

种子在土壤中能否发芽扎根，不同的种子一般具有它自己的时节性。而受精卵要发育为胚泡，植入子宫内膜，也有相应的时间限制。子宫只在某个特定时期允许胚泡植入，这一时期称为植入窗。而在此之前或之后，窗口是关闭的，胚胎无法附植到子宫内膜上。因此，母体排卵后，子宫内膜的发育必须与胚胎发育同步，两者才能协调一致，完成植入并维持胎儿发育至分娩。如果子宫内环境受到破坏或者干扰，或者胚胎未能正常发育，都难以完成植入。

植入窗口的出现是母体子宫准备好植入的信号，是子宫上皮细胞通过有关基因有序表达的结果，一个较明显的结构标志是出现羽突。目前的研究结果认为，整合素的出现是子宫内膜植入窗口期最重要的标志，至少有3种整合素基因在子宫内膜上皮的共同表达才能形成，才标志着植入的最佳时机——植入的窗口期。这个时期一般是正常月经周期的第20～24天（图7）。

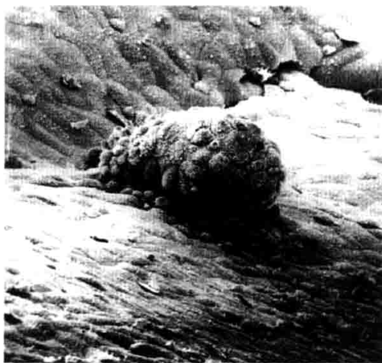


图7　人胚泡黏附于子宫内膜出现羽突结构的部位
（Bentin－Ley，1999）

植入的分子机制

植入的过程可分为黏附、埋入、定居3步。在每一步中都有相应的分子在胚泡-子宫内膜这一母胎界面做出相应的表达，使胚泡能够最终定居于子宫内膜，在母胎之间建立血供关系，为胚胎的进一步发育打下坚实的基础。

1. **黏附**

当受精卵在女性输卵管形成之后，开始不断进行细胞分裂。随着细胞数目的增加，胚胎不断地发育。同时，胚（这时候也叫胚泡）逐渐向子宫移动。与小小的胚泡相比，这时候的子宫宛如足球场之于足球。足球力竭就停到足球场的某处草坪，而胚泡则不断地游走，它停到哪里，就会从哪里进入子宫壁的子宫内膜。具体停留在哪里，现在认为主要取决于胚泡与子宫内膜之间的黏附。

因为黏附是植入的第一步骤，而整合素是黏附的关键分子，所以人月经周期中整合素的表达和子宫内膜的同步变化是胚泡着床的基础。子宫内膜受卵巢激素的周期性分泌的影响而发生相应的变化。在人体每个有排卵的月经周期中，子宫内膜仅在极短的时期内允许胚泡植入，称为植入窗，即窗口期，此时子宫内膜表现出最大的胚泡种植容受性（uterine receptivity）。子宫内膜容受性除受卵巢激素的调节外，许多细胞黏附分子也参与该过程，其中整合素起着重要的作用。Lessey BA等人用免疫组织化学的方法研究了整合素在月经周期中在子宫内膜上的表达，发现上皮细胞表达与月经周期有关的整合素为α1 、α4 、β3、αγβ3。其中α1可在黄体期观察到（正常月经周期的15～28天）；α4在增殖期出现而在黄体早期和中期突然消失；β3和αγβ3出现在黄体期中期之后（正常月经周期的19天之后），其出现时间与子宫内膜的植入窗开放同步，表明其与子宫内膜的容受性有关；αγβ3、α4β1的表达可作为评价子宫内膜容受性的良好指标。许多学者认为，可把随人月经周期动态变化的整合素α1β1、α4β3、αγβ3作为检测子宫内膜容受性的标志。

（1）ICAM-1与胚胎黏附　Lu（2002）研究认为，ICAM-1介导了滋养细胞与蜕膜血管内皮细胞的相互黏附，参与了滋养细胞向母体蜕

膜的侵入，与胚泡着床有关。Savion 等给孕第 2 ~ 5 天的早孕小鼠和孕第 7 ~ 11 天的小鼠注射抗 Mac - 1 抗体，可能影响 Mac - 1 与其配体 ICAM - 1 结合，结果导致早孕小鼠着床率降低，而对孕第 7 ~ 11 天小鼠的妊娠无明显影响，因此认为，ICAM - 1 与受体 Mac - 1 的结合有助于胚泡向子宫内膜的黏附。国内张炜（2000）、余秋波等（2007）采用逆转录聚合酶链反应技术（RT - PCR）、免疫组化和蛋白免疫印迹（Western - blot）方法研究妊娠第 1 ~ 5 天的小鼠子宫内膜，发现早孕小鼠子宫内膜的 ICAM - 1 基因和蛋白表达基本一致，在第 4 天均有显著升高；子宫内膜上皮细胞、基质细胞、血管上皮细胞均有ICAM - 1的表达，阳性细胞数量、表达强度和表达时间呈现一定规律性，即第 1 ~ 3 天略有升高，第 4 天有强表达，第 5 天略有下降。由于小鼠胚泡的着床发生在第 4 ~ 5 天，孕第 4 天是胚胎在子宫腔定位、黏附的时期，该期 ICAM - 1 的表达量最高，说明 ICAM - 1 可能与早孕期着床过程中胚胎黏附有关。

（2）ICAM - 1 在子宫内膜的表达　ICAM - 1 在人的子宫内膜上皮细胞、血管内皮细胞、基底细胞、成纤维细胞、单核巨噬细胞及淋巴细胞中都有表达，体外培养的子宫内膜上皮细胞比基质细胞表达更多。研究还发现，ICAM - 1 在蜕膜细胞及滋养层细胞的表达与着床密切相关，参与母胎细胞群的相互作用。ICAM - 1 mRNA 在孕早期蜕膜和绒毛膜的血管内皮细胞上都有表达，它的同族成员血管细胞黏附分子（VCAM）的表达量还与着床位点有关。ICAM - 1 在整个月经周期的子宫内膜的血管内皮中有规律性地表达，提示它可能参与了妊娠早期的生理过程。大量研究还发现，子宫内膜异位症患者的子宫内膜细胞 ICAM - 1分泌缺陷、数量减少，以致子宫内膜细胞之间的黏附性降低，子宫内膜细胞脱落后发生转移而发病。

（3）ICAM - 1 在胚泡的表达　研究发现，ICAM - 1 不但在子宫内膜表达，而且也在着床前的胚泡中表达。Campbell 等用分子生物学方法发现，ICAM - 1 在卵泡和着床的胚泡上有表达。张炜等发现，孕早期胚胎可以合成 ICAM - 1 蛋白，孕第 1 天的培养液中 ICAM - 1 水平较高，第 2 天降低，此后逐渐升高，第 5 天达峰值。从 2 细胞期开始，胚胎合成 ICAM - 1 的作用逐渐增强，到胚泡期达最高峰。此外还发现，ICAM - 1 在胚胎干细胞上有表达，且可能与细胞群间的聚合有关。

李南等（2007）发现在小鼠胚胎着床过程中，FucT－14I 及 sLe（X）寡糖抗原也可能参与了胚泡的定位、黏附及侵袭过程，在胚泡植入的早期发挥作用。

张群等（2007）的蛋白质组学研究结果显示，妊娠第3、5、7天小鼠子宫内膜蛋白点大约分别为713个、736个、673个。在等电点pI3～10、分子量14.4～116.0kD范围内分离的选取差异蛋白质点进行MEDLI－TOF质谱分析，查询数据库，获取有意义的蛋白点，分别为载脂蛋白A～I、膜联蛋白A1、谷胱甘肽转移酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂、烯醇化酶。研究结果表明，在胚泡植入窗口期（5天），小鼠子宫内膜合成蛋白质的种类和数量明显增加，以适应胚泡植入。

胚泡的植入也与其他一些分子相关，虽然有这些分子在帮助胚泡与子宫内膜的黏附，可是还是有一些意外发生，导致胚泡不能在子宫内合适的位置黏附，这时就会出现异位植入。有时候胚泡会跑到卵巢、肠系膜等处。在自然界，我们看到松树可以顽强地扎根于峭壁岩石之间，而人类的胚泡只有在子宫内才可能成长，异位植入对胚泡是不幸的，对母体也是危险的。所以，发现异位植入导致异位妊娠时，要及时处置，保护母亲，做长远打算，避免母子俱损的悲剧（图8）。

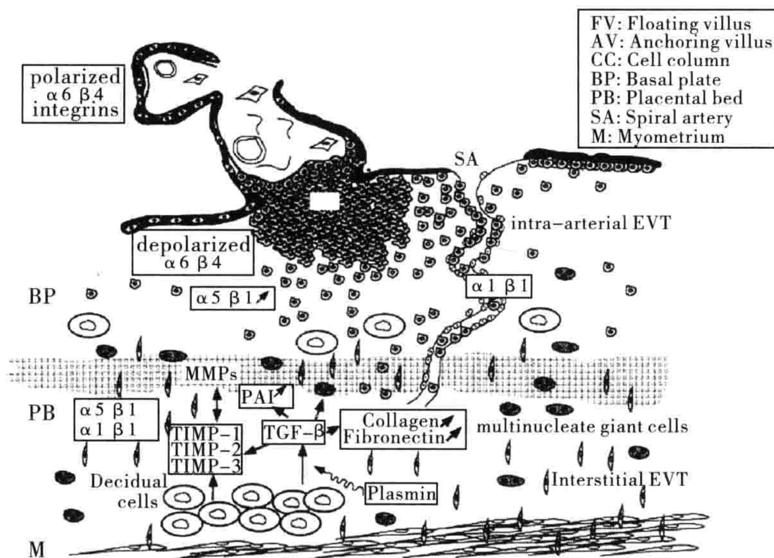


图8 黏附与植入

（Duc－Goiran，1999）

2. **埋入**

胚泡植入子宫内膜，如同种子埋入土壤，不同的是后者需要外力，而前者另有一套机制。从两个不同生命的角度看，胚泡埋入子宫内膜的过程就是胚泡外侧滋养层细胞侵入子宫内膜的过程。其中基质金属蛋白酶（MMPs）参与胚泡滋养层细胞对子宫内膜的侵袭，发挥了重要的作用。尽管细胞滋养层细胞（CTB）行为像肿瘤转移细胞，但其侵袭性只是暂时的，而且正常妊娠时侵袭只是局限于宫内膜和肌层的近 1/3 处，种子与土壤表现出恰到好处的合作。CTB 具有侵袭性行为是由于 CTB 具有分泌 MMPs 的能力。MMPs、组织金属蛋白抑制物（TIMPs）、MMP - TIMP 相互作用有助于胚胎植入的高度程序化过程，是正常植入的保证，MMP - TIMP 精密平衡的改变可能导致异常植入。我们来了解一下它们的秘密（图 9）。

首先看看 MMPs 的特性。基质金属蛋白酶（MMPs）是一类蛋白水解酶，可降解细胞外基质（ECM）的多种成分。MMPs 与 TIMPs 相互作用，共同调节 ECM 的动态平衡，参与人体多种生理和病理过程。由于生殖系统的结构和功能不断发生周期性的变化，其 ECM 水解和重建与 MMPs 的关系更密切。

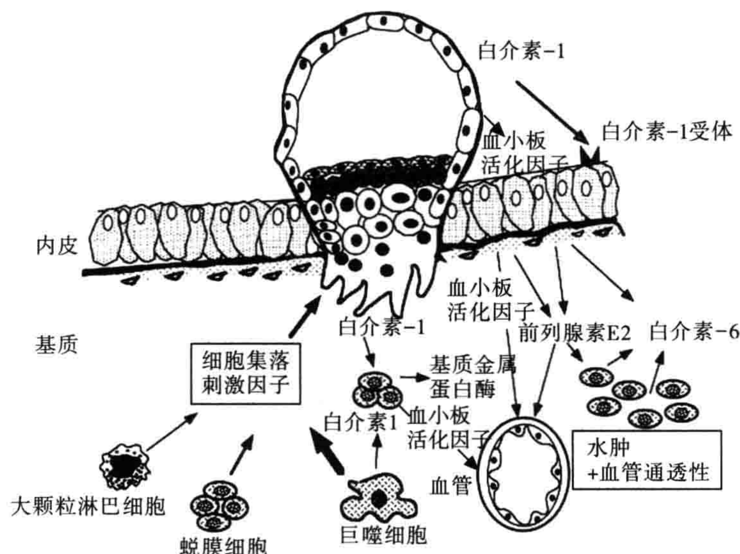


图 9　植入位点的炎症和免疫反应

（引自 Duc - Goiran，1999）

MMPs是一组锌离子依赖性内肽酶，有众多的兄弟，它们具有共同的基本性质：①均以无活性的酶原形式分泌到ECM中，需要在适当条件下激活发挥作用；②活性依赖 Zn^{2+} 的存在，Ca^{2+} 对其活性及稳定性也有一定作用；③在结构上具有40%～50%的同源性，从氨基端到羧基端依次含有信号肽、前肽（在酶原激活过程中被水解掉）和催化区3个相似的结构域，除MMP－7外，还在羧基端含有血红素结合蛋白样结构域，可能介导MMPs与ECM成分或MMPs抑制剂的结合；④体内存在天然激活剂和抑制剂；⑤至少能水解1种ECM成分。

MMPs的表达受诸多因素调节，如白血病抑制因子（UF）、表皮生长因子（EGF）、肿瘤坏死因子（INF）、白细胞介素（IL）及某些化学物质（如佛波酯等）可上调其表达，而转化生长因子、TGF、视黄醛、糖皮质激素等则下调其表达。某些激素如促性腺激素释放激素（Gn-RH）、人绒毛膜促性腺激素（HCG）、孕激素（P）可通过自分泌和旁分泌的方式调控MMPs的表达 。在体内，MMPs可被组织或血浆蛋白酶或致病菌的蛋白酶激活。研究表明，尿激酶/纤溶酶系统可水解MMPs部分肽段，使其与 Zn^{2+} 的结合变得不稳定，从而引起酶原自我裂解而被活化。MMPs的活性可被TIMPs和血浆源性抑制因子（如or2－巨球蛋白）所抑制，前者起主要作用。

TIMPs是MMPs活性的天然抑制因子，已发现了四兄弟。TIMP－1是分子量为29kD的糖蛋白，性质稳定，通过其N－末端与MMPs催化区和底物结合区以1∶1结合，抑制除MMP－2酶原之外的MMPs成员的水解活性，调节MMPs的活化并调控生长分化；TIMP－2分子量为23kD，特异性抑制MMP－2酶原活化和MMP－2的活性；TIMP－3分子量为21kD，可与ECM成分结合，抑制MMP－1、MMP－3、MMP－9的活性；TIMP－4分子量为24kD，在心脏高表达，功能尚待研究。EGF、IL、血小板衍生生长因子（PDGF）及TGF等均可影响TIMPs的表达，TIMPs与MMPs之间保持动态平衡。

Isaka等研究了MMP－2、MMP－9在人正常胎盘中作为侵袭参数的活性，利用原位杂交、免疫组化、FIZ及纯化的细胞滋养层（CTs）检测了MMP－2、MMP－9的表达和活性。发现在早期胎盘组织中MMP－

2 在绒毛外滋养细胞（EVTs）表达，MMP－9 主要在绒毛细胞滋养层细胞（VCTs）表达。FIZ 显示了 EVTs 中存在显著的明胶酶活性，在晚期胎盘组织 EVTs 中检测到类似早期中的 MMP－2 的表达，而这些细胞的明胶酶活性已经降低或完全丧失。利用纯化的 CTs 显示，在早期 CTs 中明胶酶活性显著，早期 CTs 的侵袭能力被 TIMP－2 和 MMP－2 抗体以剂量依赖模式所抑制，从而提示滋养层的侵袭能力可能被明胶酶尤其是 MMP－2 的酶活性所调控。

3. **定居**

胚泡在子宫内膜的定居是两者互相适应的结果。相比较之下，肿瘤侵袭转移与胚泡植入具有一些相似之处。

胚泡植入是播种生命之苗，肿瘤侵袭转移是叩击死亡之门，然而随着细胞生物学、分子肿瘤学、实验胚胎学、实验肿瘤学以及免疫胚胎学等的发展，科学家们通过对这两个不同的生理和病理过程的相互交叉和渗透，发现两者在许多方面具有很大的相似性，显示了生命的奥秘！首先，肿瘤侵袭的病理过程和胚泡植入的生理过程相似。肿瘤侵袭转移是一个多步骤、多环节的复杂过程，包括肿瘤细胞的黏附和脱黏附、细胞外基质（extracellular matrix，ECM）的降解和重建等过程。ECM 降解是肿瘤侵袭转移的首要步骤和分子基础，ECM 可分成基底膜和间质组织，它们都是由基底物（糖蛋白、蛋白多糖）、弹性蛋白和胶原构成的致密网络，在肿瘤的侵袭转移中它们起到屏障作用。一般认为，肿瘤细胞对 ECM 的侵袭可分成 3 个步骤：①瘤细胞通过其表面受体特异地黏附到基质成分上；②肿瘤细胞相关的溶蛋白酶对基质的局限性降解，即肿瘤或宿主细胞的蛋白酶使贴近肿瘤细胞表面的有限区域内的基质发生降解；③肿瘤细胞移入被蛋白酶水解后的基质区。这三个步骤的重复将导致肿瘤细胞持续侵袭，直至达到远处转移。相类似的情况也发生在胚胎早期发育过程中，绒毛外滋养层细胞（extravil－lous trophoblast cells，EVT）经黏附、降解 ECM 并穿越 ECM 间隙，完成对子宫蜕膜的侵袭，建立胎盘并使胚胎深深地植入子宫内膜。胚胎滋养层对子宫内膜的侵入与高度侵入性肿瘤的侵袭转移相似，而且 EVT 失去控制的侵入会造成已知最具转移性的绒癌。其次，ECM 降解酶在肿瘤侵袭转移与胚泡植

入过程中的作用相似。胚胎滋养层细胞和肿瘤细胞均能合成纤溶酶原激活因子（plasminogen activator，PA）和基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）。PA 有尿激酶型（urokinase - type PA，uPA）和组织型（tissue - typePA，tPA）两种形式。MMPs 作为一类锌离子依赖性内肽酶，在合成后立即被分泌到 ECM，参与 ECM 的降解和重建。研究表明，MMP - 9 介导了人细胞滋养层细胞的侵袭，并且 MMPs/TIMPs 间的平衡表达对调节滋养层侵入子宫的深度有重要意义。

黏附分子 CD146 在胚泡植入过程中具有重要作用。Shih 等于 1996 年首次报道 CD146 在人体滋养层细胞中表达。研究发现，CD146 在正常胎盘植入部位的中间滋养层细胞（intermediate trophoblastic，IT）中有表达，在葡萄胎和胎盘部位滋养层细胞瘤（placentalsite tropho - blastic tumor，PSTT）中的表达局限于 IT 中，而在细胞滋养层细胞（cytotrophoblastic cells，CT）和合体滋养层细胞（syncytiotrophoblast，ST）中未检测到表达，认为 CD146 是正常胎盘、植入位点以及妊娠滋养层损伤中 IT 分化的一个特异和灵敏的标记物。在正常妊娠胎盘中，CD146 选择性地表达于侵入性滋养层细胞，而在滋养层细胞侵入不足的先兆子痫患者的胎盘中，CD146 分子的表达降低，甚至缺失。随后的免疫荧光实验显示，CD146 分子选择性地表达在具有侵袭能力的中间滋养层细胞，而在非侵入性的细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞中不表达。这些研究结果提示，CD146 的表达和滋养层细胞侵入能力密切相关，可能在胚泡植入中发挥重要的作用。那么，CD146 是如何调节滋养层细胞侵袭的呢？

一方面，CD146 可显著抑制滋养层细胞的黏附和迁移。Liu 等从妊娠第 8 天的小鼠子宫中分离外胎盘锥，将其培养在含 20mg/L 抗 CD146 抗体的培养基中，结果抗 CD146 抗体不影响外胎盘锥滋养层细胞与培养板中的层粘连蛋白黏附，但是它对滋养层细胞从外胎盘锥中迁移出来的行为有强烈的抑制作用，培养 36 小时迁移抑制率超过 40%。Shih 等应用永生性种植部位型、中间型滋养细胞系 IST - 1，研究了 CD146 在植入位点滋养层与子宫平滑肌相互作用中的功能，结果表明，IST - 1 细胞表达 CD146，但不表达 CD146 假想受体，而子宫平滑肌细胞表达这种受体且能与 IST - 1 细胞表面上的 CD146 结合，在滋养层细胞中这

种结合较稳定。因此，他们设想 CD146 限制种植过程中滋养细胞在子宫肌层内游走、侵袭，从而限制了滋养层细胞的迁移。Anfosso 等则认为，CD146 可能作为信号转导分子参与细胞骨架的重组和焦点着斑的形成，从而对黏附迁移起调控作用。

另一方面，CD146 可显著抑制滋养层细胞分泌基质金属蛋白酶。目前，公认 MMPs 对 ECM 的降解是滋养层细胞侵袭子宫蜕膜的关键步骤，其中 MMP－9/TIMP－3 被认为是 ECM 降解的主要调节因子。Liu 等用明胶酶谱法检测外胎盘锥滋养层细胞培养上清液中基质金属蛋白酶的活性，结果发现，用 IgG 处理的对照组培养液中 MMP－9 酶活性很高，而抗 CD146 抗体组中 MMP－9 酶活性显著下降，这说明抗 CD146 抗体能抑制滋养层细胞分泌 MMP－9。由于影响滋养层细胞侵入性的两个关键要素——细胞迁移和基质金属蛋白酶的分泌都受到 CD146 特异抗体的显著抑制，故认为黏附分子 CD146 是影响细胞侵入行为的关键分子。

植入的保障：免疫隔离

种子总是受到土壤的拥抱，孩子总是得到妈妈的关怀。但是，胚泡在植入子宫内膜的时候，胚泡代表一个新生命个体，子宫内膜则是母体。在人与人接触的生物学法则中，有一条叫作免疫，出于对外界的防卫和自身的防护，一个生命对另一个生命的亲密接触会发起免疫攻击，母子也不例外。但是，在胚泡植入的时候、胚胎发育的时候，母体对胚胎却没有在第一时间发起防卫性攻击，反而能接受胚胎的侵入、定居，还源源不断地为其提供营养，这是为什么呢？这就要提到胚胎与母体之间的免疫隔离了。一方面，母体的免疫系统受到一定的抑制，确保对胚胎不发生免疫排斥；另一方面，对胚胎的抗原具有一定的识别与反应能力，限制胚胎滋养层细胞过度对子宫内膜的入侵。这也涉及众多的分子所做的工作。

人类白细胞 G 抗原（HLA－G）是特异性表达在母胎界面上的一种蛋白。滋养层细胞不表达经典的 HLA－Ⅰ和 HLA－Ⅱ，而表达

HLA－G，它可能是一种自然杀伤细胞（NK 细胞）的共同配体，保护胚胎免受 NK 细胞的杀伤作用。HLA－G 通过与 T 细胞上的 KIR 受体结合，抑制杀伤性 T 细胞的杀伤功能。HLA－G 还可以调节蜕膜和外周单核细胞的细胞因子释放，使肿瘤坏死因子－α（TNF－α）和 IFN－γ 降低，IL－4 升高，促使辅助性 T 细胞（ Th ）Th1/Th2 细胞因子的平衡向 Th2 偏移，有利于胚胎在子宫内膜的发育；如果 HLA－G 表达不正常，Th1/Th2 细胞因子的平衡向 Th1 偏移，则可能导致不育。

ICAM－1 不但参与了胚泡的植入，还与胚泡与母体之间的局部免疫调节有关。李宾（1999）采用流式细胞技术发现生理状态下着床期小鼠外周血淋巴细胞（PBLC）中 ICAM－1 的表达于胚泡识别、黏附前即妊娠第 2 天（D2）降至最低；而子宫内膜/蜕膜细胞（EC/DC）中的 ICAM－1表达于胚泡完成植入时即妊娠第 4 天（D4）达最低点，与 PBLC 相比滞后 2 天，因此认为在该阶段 PBLC 及 EC/DC 表面 ICAM－1 的相继降低体现了整体和局部在着床这一特定时期免疫反应性的降低，而且这种免疫反应的改变其整体变化在先，局部变化在后，提示了由 ICAM－1/ LFA－1 介导的静息淋巴细胞的活化及白细胞与内皮细胞的黏附、游走等作用受到抑制，而这种抑制作用参与了胚泡着床过程中局部免疫耐受的形成。Igor 等（1994）的研究发现，早孕 10 周的人蜕膜组织中，CD3 细胞的ICAM－1表达明显高于外周血淋巴细胞的 ICAM－1 表达。Peter（1994）的组化实验亦显示早孕人蜕膜淋巴细胞有大量 ICAM－1 表达。Takeshita（2000）成功地利用抗体封闭 ICAM－1 与 LFA－1 之间的对话调节 Th1/Th2 平衡，减少聚集的自然杀伤细胞的活性，抑制免疫介导的流产。还有研究发现，ICAM－1/IFA－1 结合是母胎接合面免疫耐受和免疫整合的主要调节者，ICAM－1/LFA－1 之间的对话导致前炎性细胞因子迁移至着床位点，促使蜕膜的树突状细胞成熟，诱发局部辅助 T 细胞（Th1）增加参与母胎面的免疫耐受形成。

植入与试管婴儿及人造子宫

如果能够正常地完成胚泡植入子宫内膜，在免疫隔离的保护之下，一般就可以开始憧憬怀胎十月的孕育之旅了！就像常说的落地生根，开枝散叶。但是也有一些夫妇因为某些因素，不能完成正常的植入，就不得不面对没有自己孩子的困境了。如果在古代，可能就只能看看别人瓜熟蒂落收获喜悦，而自己徒呼奈何。现在生物学技术的发展为他们提供了一种可能，这就是体外受精－代孕，也就是用父亲的精子和母亲的卵子在体外受精，获得受精卵，得到可以植入的胚泡，然后把该胚泡植入健康的能生养的另外一名女性的子宫，最后生出属于父母自己遗传物质的孩子。当然，这一技术还面临社会、伦理、法律问题。如何在大家都能接受的情况下实现不能自己生养的父母生养孩子的愿望，抛却技术问题，就是社会问题了。毕竟，种子与土壤是自然属性的，胚泡和子宫是社会属性的。

自然界的种子可以在此处土壤生根，也可以在彼处土壤生根，而胚泡与子宫，最为理想的则是自己母亲的子宫。但是，在不得已的情况下，这个新生命能否降临于世，取决于社会能否给他提供一个人造子宫。

那么，现在有没有人造子宫呢？能否从技术上解决这一问题？

人造子宫是通过模拟哺乳动物子宫和卵生动物卵的条件，使受精卵在人造环境下发育。从理论上讲，人造子宫可以使胚泡摆脱对母体的依赖。现有技术还不能完全做到这一点，但如同其他技术一样，人造子宫在不断地取得进步，不见得就永远不可以被研究出来。

1993 年，日本科学家 Unno 等将怀孕中期的山羊胎儿从其母体子宫中取出，放于一个灌满成分类似羊水的溶液的所谓“子宫箱”里，通过人造胎盘模拟子宫为山羊胎儿输送营养，保证代谢，成功地使山羊胎儿在人造子宫中生长了 3 个星期。该技术现在在不断的发展中。

2002 年，美国科内尔大学刘洪清博士领导的研究小组通过组织工

程技术将人类子宫内膜细胞做成了子宫的三维结构体。当受精的人类卵子被放置到这个子宫里，它就附着在子宫壁上，从而进入自然怀孕阶段。不过，6 天后，这个实验被中止，出于伦理的考量，美国法律限制进行人造子宫试验。刘博士的研究小组进一步用老鼠的胎儿进行了实验，从受精卵开始到几乎整个孕期结束全部都是在人造子宫中进行的，不过，就像日本科学家做的实验一样，新出生的动物没有成活。

2012 年，英国诺丁汉大学 Kevin Shakesheff 报道，他们与合作者已经开发出一种能将受精卵在人工环境下培育更长时间的设备。它能够模拟子宫中柔软的组织，功能虽然离真正的子宫还相去甚远，但由于迈出了重要一步而被形象地称为人造子宫。用实验鼠受精卵进行的实验显示，受精卵在这个人造子宫中可以培育到第 8 天。这几天的差距在胚胎的发育中非常重要。在前 4 天，受精卵还只能发育到囊胚期，是一个由几十个细胞组成的胚；而在第 4 天至第 8 天，一些器官会开始发育。但是到 12 天后，人造子宫中的胚胎都夭折了。

如果人造子宫技术的发展得到成功，体外受精与人造子宫两大技术或许会揭开人类繁衍的新篇章。技术的进步固然会给部分家庭带来孩子欢笑的喜悦，但也可能会减少家庭的亲情感觉，毕竟怀孕生育相比人造子宫孵育减少了太多的母胎联系。

但是，如同人造子宫技术的研究者——康奈尔大学的 Hung - Ching Liu 女士所说：“人造子宫所带来的问题并不是在于科技进步，而在于人的具体操作上。怎么利用法律去限制这项科技成果被滥用？如果把这项科技转换成医学上的成果来解决患者的问题，那么将给人类带来福音。这些问题应该由法律专家去解决，而不能让科学家自己去解决。”

生物技术的飞速发展，使孕前、产前检查越来越进步，不但给正常的胚泡植入带来更多的保障，也为原本不能进行的胚泡植入带来了希望。也许不远的将来，如果准母亲愿意自己选择，就像种子坠地即可生根，人类的胚泡也可脱离母亲的子宫，自由地发育为健康的胎儿，呱呱坠地！

（金晓航）

参考文献

[1] Bentin - Ley U, Sjogren A, Nilsson L, et al. Presence of uterine pinopodes at the embryo - endometrial interface during human implantation in vitro. Hum Reprod, 1999, 14: 515 - 520

[2] Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human. Rev Endocr Metab Disord, 2002, 3: 107 - 117

[3] Savion S, Irlin J, Shepshelovich J, et al. Anti - Mac - 1 antibodies and early pregnancy loss in mice. J Reprod Fertil, 1996, 107: 7 - 10

[4] Wu MH, Yang BC, Lee YC, et al. The differential expression of intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM - 1) and regulation by interferon - gamma during the pathogenesis of endometriosis. Am J Reprod Immunol, 2004, 51: 373 - 380

[5] Thomson AJ, Greer MR, Young A, et al. Expression of intercellular adhesion molecules ICAM - 1 and ICAM - 2 in human endometrium: regulation by interferon - gamma. Mol Hum Reprod, 1999, 5: 64 - 70

[6] Isaka K, Usuda S, Ito H, et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. Placenta, 2003, 24: 53 - 64

[7] Wang H, Wen Y, Mooney S, et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression in human preimplantation embryos. Fertil Steril, 2003, 80 (2): 736 - 742

[8] Wang H, Li Q, Shao L, et al. Expression of matrix metalloproteinase - 2, - 9, - 14 and tissue inhibitors of metalloproteinase - 1, - 2, - 3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (Macaca mulatta) during early pregnancy. Biol Reprod, 2001, 65: 31 - 40

[9] Liu Q, Yan X, Li Y, et al. Pre - eclampsia is associated with the failure of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) expression by intermediate trophoblast. Lab Invest, 2004, 84: 221 - 228

[10] Anfosso F, Bardin N, Vivier E, et al. Outside - in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells. J Biol Chem, 2001, 276: 1564 - 1569

[11] Whiteside EJ, Jackson MM, Herington AC, et al. Matrix metalloproteinase - 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase - 3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. Biol Reprod, 2001, 64: 1331 - 1337

[12] Blois S, Tometten M, Kandil J, et al. Intercellular adhesion molecule - 1/LFA - 1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the feto - maternal interface in murine pregnancies. J Immunol, 2005, 174: 1820 - 1829

[13] Bulletti C, Palagiano A, Pace C, et al. The artificial womb. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1221: 124 - 128

[14] Unno N, Kuwabara Y, Okai T, et al. Development of an artificial placenta: survival of isolated goat fetuses for three weeks with umbilical arteriovenous extracorporeal membrane oxygenation. Artif Organs, 1993, 17: 996 - 1003

[15] Unno N, Baba K, Kozuma S, et al. An evaluation of the system to control blood flow in maintaining goat fetuses on arterio - venous extracorporeal membrane oxygenation: a novel approach to the development of an artificial placenta. Artif Organs, 1997, 21: 1239 - 1246

[16] Gray BW, El - Sabbagh A, Zakem SJ, et al. Development of an artificial placenta V: 70 h veno - venous extracorporeal life support after ventilatory failure in premature lambs. J Pediatr Surg, 2013, 48: 145 - 153

[17] Schoberer M, Arens J, Lohr A, et al. Fifty years of work on the artificial placenta: milestones in the history of extracorporeal support of the premature newborn. Artif Organs, 2012, 36: 512 - 516

[18] Morris SA, Grewal S, Barrios F, et al. Dynamics of anterior - posterior axis formation in the developing mouse embryo. Nat Commun, 2012, 3: 673

专题5

长生不老之梦

——胚胎干细胞

胚胎干细胞概述

千百年来，人类一直在研究和寻找能治愈各种疾病、抗衰老，甚至长生不老的方法。随着干细胞研究的深入，特别是胚胎干细胞的研究，人类的这些幻想正在逐步变成现实。1998年，*Science*杂志将干细胞的研究成果列在十大科学进展的首位。干细胞（stem cell，SC）是一类具有自我更新、高度增殖和具多向分化潜能的细胞群体。干细胞发育为不同形态和不同功能的独特细胞类型，这个过程就称为细胞分化。在细胞的分化过程中，细胞往往由于高度分化而完全失去了再分裂的能力，最终衰老死亡。机体在发展适应过程中为了弥补这一不足，保留了一部分未分化的原始细胞。因此，干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞。根据个体发育过程中出现的先后次序和发育潜能的不同，人们将干细胞分为胚胎干细胞（embryonic stem cell，ESC）和成体干细胞（adult stem cell，ASC）。

ESC主要从植入前囊胚的内细胞群分离得到，ESC具有发育上的全能性，可以分化为完整个体的所有组织细胞。ASC是存在于胎儿和成体

不同组织内的多潜能干细胞，这些细胞具有自我复制能力，并能产生不同种类的具有特定表型和功能的成熟细胞，能够维持机体功能的稳定，发挥生理性的细胞更新和修复组织损伤的作用。目前发现的 ASC 主要有造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、肝干细胞、皮肤干细胞和肠上皮干细胞等。ESC 和 ASC 具有 3 个不同于其他类型细胞的特征：①干细胞是非特化的细胞；②干细胞有长期的细胞分裂和自我更新的能力；③在一定的生理或实验条件下，干细胞能诱导分化为具有特殊功能的细胞，例如心肌纤维或胰岛素分泌细胞等。

干细胞的研究提高了我们对单细胞如何发育为生物体和在成年生物体内健康细胞如何替代损伤细胞的认识。这个很有前景的科学领域，也引导着科学家们探索建立以细胞为基础的治疗方法，治疗涉及再生或修复过程的疾病。科学家们预测，在不久的将来，干细胞可能用于建立细胞基础疗法，治疗诸如帕金森病、糖尿病和心脏病等疾病。干细胞不仅能用于细胞基础疗法，而且也可用于筛选新的药物和毒素，以及了解先天性缺陷。所以，干细胞是现代生物学的一个最吸引人的研究领域。然而，为了发展细胞基础治疗科学，还必须进一步研究胚胎干细胞的基本特性，其中最关键的是，揭示胚胎干细胞为何能长期保持非特化状态和自我更新能力，以及引起胚胎干细胞分化为特化细胞的信号机制。

胚胎干细胞具有来源于胚胎、具有自我更新能力和多潜能性等特性。①胚胎干细胞来源于胚胎，取自经体外受精的受精卵发育形成的胚泡（blastocyst）。受精卵经过一系列的卵裂，产生卵裂球，形成桑葚胚（morula）。每个卵裂球都是未定向、未分化的细胞。在发育第 5 天时，桑葚胚发育为胚泡。内细胞群（inner cell mass）是在胚泡腔一端的大约由 30 个细胞组成的细胞群。内细胞群细胞具有分化为任何类型细胞的潜能。如果将内细胞群从正常的胚胎环境中取出，在适当的条件下培养，内细胞群细胞能继续无限期的增殖和自我复制，而且保持分化为任何类型细胞的潜能。这些多潜能的内细胞群衍生的细胞就是胚胎干细胞。②与不能正常自我复制的肌细胞、血细胞或神经细胞等已分化的细胞不同，胚胎干细胞能长期、多次地自我复制而不分化。干细胞多次自我复制的过程称增殖。非特化的细胞产生特化细胞的过程称分化（differentiation）。在实验室内，干细胞群增殖数月后能产生数百万个细胞。如果所产生的细胞仍然是非特化的细胞，与亲代干细胞一样，则表明细

胞有长期自我更新（self - renewal）的能力。③胚胎干细胞能分化产生内、中、外3个胚层，每个胚层分别分化形成身体的各种组织和器官，发育形成完整个体，这种特性即为胚胎干细胞的多潜能性（pluripotency）。胚胎干细胞的多潜能性引起科学家们的重视虽已多年，但关于使胚胎干细胞具有多潜能性和其他细胞具有有限的发育潜能的因子尚知之甚少。转录因子 Oct - 4 曾被用作胚胎干细胞和整个胚胎的多潜能细胞的主要标志物，并认为 Oct - 4 的表达必须保持在必要的水平，胚胎干细胞才能保持未分化状态。然而，仅 Oct - 4 本身仍不足以保持胚胎干细胞处于未分化状态。最近鉴定了另一个转录因子 Nanog，研究表明，它对保持小鼠胚胎干细胞的未分化状态也是必要的。当小鼠胚胎干细胞分化时，Nanog 的表达迅速减少，当通过结构性启动子维持 Nanog 的表达水平时，小鼠胚胎干细胞能够在没有白血病抑制因子（leukema inhibitory factor，LIF）或骨形成蛋白（bone morphogenetic proteins，BMPs）的无血清培养基中保持未分化状态和增殖。人类胚胎干细胞也表达 Nanog，但其表达水平很低，它在人类胚胎干细胞中的功能仍在研究中。

胚胎干细胞的分离与鉴定

1998 年，Thomson 等报道由人类胚泡的内细胞群获取和培养人类胚胎干细胞获得成功，开创了干细胞生物学研究的新时代。用于获取人类胚胎干细胞的胚泡是经体外受精产生的，由治疗不育症的夫妇捐赠的。获取的胚胎干细胞经多次传代培养，保持了它们的正常核型，维持了高水平的端粒酶活性，表达有代表性的人类胚胎干细胞特有的标志物。将建立的胚胎干细胞系注入免疫缺陷小鼠可形成畸胎瘤（teratoma）。畸胎瘤含有来自所有3胚层的细胞类型，证明人类胚胎干细胞具有多潜能性。同年 Gearhart 领导的研究组从流产胎儿的生殖嵴和间充质中获取了人类胚胎生殖细胞（human embryonic germ cells），经大约20代传代培养，保持了细胞的正常核型。这些细胞自发地形成自然分化的聚集物，并最终含有所有3胚层的衍生细胞。它们的多潜能性指征还包括表达有代表性的小鼠胚胎干细胞和胚胎生殖细胞特有的标志物。但将其注入免疫缺陷小鼠时，胚胎生殖细胞不形成畸胎瘤。2000 年后，新加坡和澳

大利亚的科学家们也报道了获得、培养和鉴定人类胚胎干细胞的研究成果。后来，由于取得了新的人类胚胎干细胞系，并成为共享的资源，有许多科学家研究和报道了控制胚胎干细胞体外定向分化的方法，其目的多数是针对生产用于移植的人类组织细胞，包括分泌胰岛素的胰岛细胞、释放多巴胺的神经元和心肌细胞等。

胚胎干细胞的分离

目前人类胚胎干细胞主要由以下几种途径获得：①从囊胚之前的晚期桑葚胚中获得；②从人工授精多余冷冻胚胎的囊胚内细胞团中分离得到；③从流产胚胎的原始生殖嵴中分离获得（称为胚胎生殖细胞，EG 细胞）；④从用于基因治疗的克隆胚胎内细胞团中分离得到（图 10）。

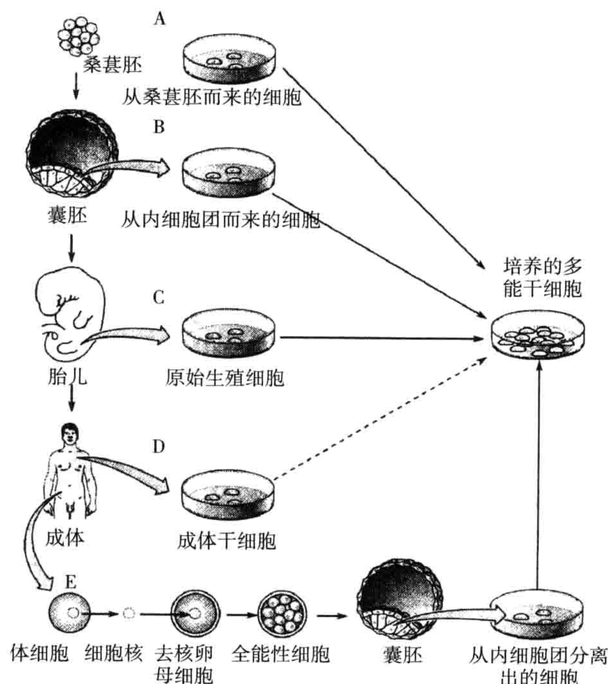


图 10　获得人类胚胎干细胞的方法
（引自 NIH，2000，经修改）

ESC的分离是将内细胞群转移到含有培养基的培养皿内，然后使细胞分散在培养皿的表面。培养皿的内表面涂有一层小鼠胚胎的成纤维细胞，它们是经过处理后不能分裂的细胞，这个细胞涂层称饲养层，作用是给内细胞群细胞提供一个黏性的表面，使它们能够附着；另外，饲养细胞能释放营养素进入培养基。最近，已开始设计没有小鼠饲养细胞的培养胚胎干细胞的方法。这一方法可以避免小鼠细胞中的病毒或其他大分子传播给人类细胞的危险。

经过数日的培养，内细胞群的细胞增殖，逐渐长满培养皿。此时将它们轻轻地分开，并装入几个新鲜的培养皿中。重新分装细胞的过程重复多次和经过数月，这个过程称传代培养（subculturing）。传代培养细胞的每个周期称传代（passage）。在6个月以后，由内细胞群最初的30个细胞产生了数百万个胚胎干细胞。在细胞培养中，经6个月的增殖而没有分化的胚胎干细胞是多潜能的细胞，在遗传学上是正常的，称胚胎干细胞系（embryonic stem cell line）。细胞系一旦建立，将一次生产的细胞冻结贮存，运送到其他实验室用于进一步培养和实验。

人类胚胎干细胞的理想培养基应具备的条件：①应该是成本低和容易使用，以利于更多的研究者能采用人类胚胎干细胞作为研究工具；②应该完全由非动物来源的成分组成；③能使细胞生长形成克隆；④能使培养中遗传性改变和遗传外改变的速度降到最低。这样的培养基尚有待开发。

胚胎干细胞的鉴定

在建立胚胎干细胞系过程的不同阶段检测细胞，判断它们是否显示胚胎干细胞的基本特性，这个检测过程称鉴定。

1．检测方法

迄今为止，研究人类胚胎干细胞的科学家们，对检测干细胞基本特性的标准成套检测方法尚未取得一致意见。而且科学家们承认，他们所采用的许多检测方法，可能不是细胞最重要的生物学特性和功能的最好

指征。因此，培养人类胚胎干细胞系的各实验室采用了多种检测方法。目前常用的方法如下：

（1）形态学检测　胚胎干细胞经过几个月的培养和传代培养后，仍长期保持自我更新和复制的能力。通过显微镜观察细胞是否健康和保持未分化状态。

（2）表面标志物的检测　采用特殊技术检测只有未分化细胞才表达的表面标志物。常用的标志物有 SSEA－1、SSEA－3、SEA－4、TRA－1－60 和TRA－1－81等。因为未分化细胞具有 Oct－4 蛋白，故检测干细胞的 Oct－4 表达是较为肯定的检测方法之一。

（3）染色体检查　评估染色体是否有损害或染色体编号是否有改变。

（4）细胞传代能力的检测　确定在冻结、融化和贮存后细胞是否能传代培养。

（5）检测细胞多向潜能性　①使细胞在细胞培养中自然分化；②通过诱导使细胞分化形成特殊类型的细胞；③将细胞注入免疫抑制小鼠以检测畸胎瘤的形成，畸胎瘤特有的含有许多分化的或部分分化的细胞类型，提示细胞有分化为多种类型细胞的能力；④将干细胞进行标记，注入小鼠的胚泡内，观察胚胎发育过程中细胞的嵌合性和分化潜能。

2. 界定标准

目前认为，必须符合如下标准才可以称为胚胎干细胞：

（1）来源于胚泡的内细胞群。

（2）有无限的对称分裂而不分化的能力（长期的自我更新）。

（3）稳定的正常核型。

（4）多潜能的胚胎干细胞能产生来自胚胎三个胚层（内胚层、中胚层、外胚层）的分化细胞类型。

（5）有嵌入发育期间所有胎儿组织的能力（长期培养的小鼠胚胎干细胞被输入胚胎而发生嵌合体动物时，仍能产生任何组织）。

（6）有形成生殖系集落，发生卵和精子的能力。

（7）单个的胚胎干细胞能产生在遗传上完全相同的细胞集落，或具有与起源细胞相同特性的克隆。

(8) 表达转录因子 Oct－4，它能激活或抑制许多靶基因，并使胚胎干细胞保持增殖和不分化状态。

(9) 能被诱导持续增殖或分化。

(10) 在细胞周期中没有 G_1检验点，胚胎干细胞在细胞周期的 S 期度过的时间最长，在这个时期它们合成 DNA。与分化的体细胞不同，胚胎干细胞不需要任何外界刺激启动 DNA 复制。

(11) 不显示 X 染色体失活。在雌性哺乳动物的每个体细胞中，2 条 X 染色体中有 1 条是长期失活的。在未分化的胚胎干细胞中不发生 X 染色体失活。

胚胎干细胞的定向分化

培养中的胚胎干细胞能在一定条件下生长，并能保持未分化的（非特化的）状态。但如果细胞互相结块，形成拟状体，它们就开始自然分化而形成肌细胞、神经细胞和许多其他类型的细胞。虽然这种自然分化可以作为胚胎干细胞是否健康培养的有效指征，但这种培养不能作为生产特殊类型分化细胞的有效方法。为了生产特殊类型的分化细胞，如心肌细胞、血细胞或神经细胞，尚须设法控制胚胎干细胞的分化方向。目前常采用的方法有改变培养基的化学成分，改变培养皿的表面，或通过插入特殊的基因修饰细胞等。经过多年的实验，建立了胚胎干细胞定向分化（directed differentiation）为某些特殊类型细胞的若干基本方案（图 11）。

已报道的来自小鼠胚胎干细胞的分化细胞类型有脂肪细胞、星形胶质细胞、心肌细胞、软骨细胞、定向造血细胞、树突状细胞、内皮细胞、角质细胞、淋巴样祖细胞、肥大细胞、神经元、少突胶质细胞、成骨细胞、胰岛细胞、原始造血细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞等。近年来报道的人类胚胎干细胞分化的特殊细胞系有神经细胞、心肌细胞、血管内皮细胞、造血细胞、肝细胞、胰岛细胞、骨细胞、滋养层细胞和多谱系细胞。

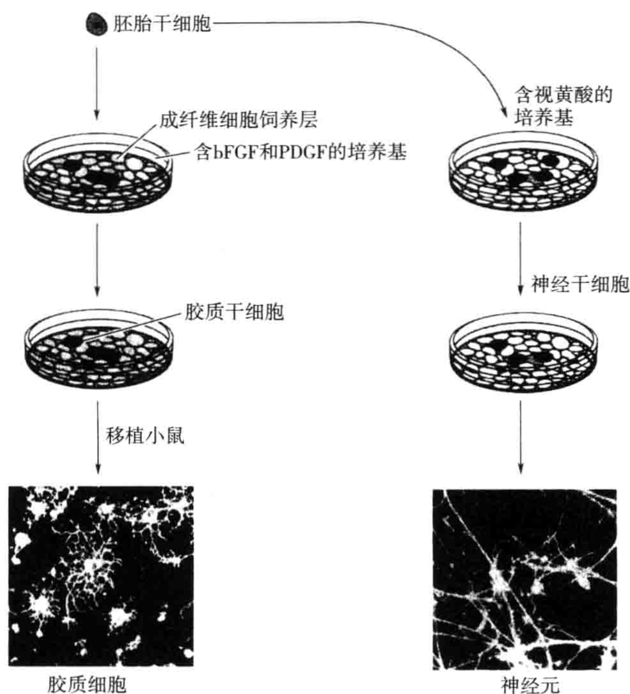


图 11　胚胎干细胞的诱导分化

（引自 Gilbert SF，2000）

如果能成功地诱导胚胎干细胞定向分化为某种特殊类型的细胞，就可能利用经诱导所产生的分化细胞治疗某些疾病。通过移植由人类胚胎干细胞诱导产生的细胞可能治疗的疾病包括帕金森病、糖尿病、外伤性脊髓损伤、蒲肯野细胞变性、心脏病以及视觉与听觉缺失等。

人们对于启动干细胞分化的细胞内部和细胞外部的信号已开始有所了解。内部信号受细胞基因的控制，它携带细胞的全部结构和功能编码指令。细胞分化的外部信号包括由其他细胞分泌的化学物质、与毗邻细胞的物理性接触和细胞微环境中的某些分子。

关于干细胞分化仍有许多问题有待研究。例如，各种类型干细胞的内部和外部细胞分化信号是否都是类似的？能否确定特殊的信号组合，以促进干细胞分化为特殊类型的细胞？探讨这些问题将有助于我们发现控制干细胞分化的新途径，从而培养出能用于包括细胞基础治疗在内的特殊目的的细胞和组织。

胚胎干细胞的潜在应用前景

干细胞是目前细胞工程研究最活跃的领域，随着基础研究、应用研究的深化，这项技术将会在相当大程度上引发医学领域的重大变革。生命科学工作者和医学科学工作者正在把精力集中于干细胞工程的研究和开发上，干细胞研究已成为生命科学领域一个重要热点。人类干细胞用于基础和临床研究的方法很多，但要实现临床应用还有许多技术障碍，只有通过继续加强干细胞的基础研究才能克服。

1. 发育生物学的基础研究

胚胎干细胞的出现为深入了解哺乳动物早期胚胎发育的过程提供了卓越的体外研究工具。由于胚胎干细胞能无限地增殖和产生任何类型的细胞，因此人类胚胎干细胞为人体组织的分化和功能的基础研究提供了一个崭新的途径。通过人类胚胎干细胞的研究，可以得到关于人体发育期间发生的复杂事件信息。在哺乳动物胚胎干细胞分化过程中，通过悬浮培养技术，胚胎干细胞可聚集成团，自发分化成多细胞结构，即拟胚体（embryoid body，EB）。利用胚胎干细胞分化的拟胚体，为研究哺乳动物胚胎早期发育的细胞和分子水平调控机制，及影响胚胎发育的因素提供了方便。这个工作最主要的目标，是查明未分化的干细胞是如何变成分化细胞的。同时人们也可通过对大量人胚胎发育过程中不同时期细胞基因表达的观察，来认识畸形胎儿的发生机制。转动基因的开关是这个过程的中心环节。某些最严重的疾病，如肿瘤和先天性缺陷，是由于异常的细胞分裂和分化引起的，而深入地了解这些过程的遗传和分子调控机制，可以得到产生这些疾病的有关信息，并寻求新的治疗策略。干细胞应用的重要障碍是，尚未完全掌握调控特殊的基因开关以控制干细胞分化信号系统的理论和技术方法。

2. 新药检测

人类干细胞也能用于检测新药。首先，采用由人类多潜能细胞系产生的分化细胞可以提高检测新药物的安全性。例如，因为没有人类心肌

纤维系，而不能用人类心肌纤维检测新药，研究者们只能依赖于动物模型。然而，因为在动物和人类的心脏之间存在物种的特异性差异，有时会使对人类心脏有毒性的药物进入临床试验，甚至导致患者死亡。所以在进入临床试验之前，用人类胚胎干细胞衍生的心肌细胞鉴别新的药物是非常有价值的，它会加速新药发现的过程，带来更安全、更有效的治疗。当然，这样的实验不只限于心肌细胞，也能用于来源困难的任何类型的人类细胞。其次，多潜能干细胞的优越性是能在广泛的细胞系范围检测药物。为了有效地筛选药物，当比较不同药物的效果时，细胞的条件必须相同。所以，必须精确地控制干细胞分化为将要用以检测药物的特殊类型细胞。但根据控制分化信号的现有知识，尚不能模拟这些条件，不能精确地生产始终相同的分化细胞，用于检测每种药物。

3．临床重要疾病的治疗

人类胚胎干细胞能为常见的变性疾病的移植疗法提供大量组织细胞。有些严重的疾病是由于一种或数种类型细胞的死亡或功能障碍引起的，例如，糖尿病的胰岛素生成细胞或帕金森病的多巴胺能神经元，更换这些细胞能使这些疾病获得根治。所以，利用人类干细胞产生能用于细胞基础治疗的细胞和组织，将是一个重要的研究领域。目前，捐献的器官和组织多用于替换患病或破坏的器官。但是，可用于移植的组织和器官的来源困难，价格昂贵。干细胞定向分化特殊类型的细胞，提供了用于替换细胞和组织的新的可能来源，有望用于治疗帕金森病、阿尔茨海默病、脊髓损伤、卒中、烧伤、糖尿病、骨关节炎和类风湿关节炎等。

现在已能在实验室内生产健康的心肌细胞，然后移植给慢性心脏病患者。利用小鼠或其他动物所进行的初步研究表明，骨髓干细胞移植给损坏的心脏，能产生心肌细胞，并成功地再生心脏组织。细胞培养的最新研究表明，胚胎干细胞或成体骨髓细胞可能直接分化为心肌细胞。

由于胚胎干细胞在特定的环境和诱导因素的作用下，可以无限增殖和分化成体内所有类型的功能细胞，因此可以用来替换或修复那些由于疾病或损伤造成的组织器官功能缺陷。任何因物理、化学或生物因素等造成的细胞损伤或病变引起的疾病都可以通过移植由胚胎干细胞定向分化而来的

特异组织细胞或器官来治疗。另外，利用胚胎干细胞作为供体还可避免可能会产生的排异反应，这样就可能解决一直困扰着免疫学界及医学界的同种异型个体间的移植排斥难题。近年来，人类在胚胎干细胞体外定向诱导分化上已取得一些成功，这为人类开展上述研究奠定了基础。

应用胚胎干细胞进行基因治疗应具备以下条件：大量地增殖和产生足够量的组织，分化为想得到的细胞类型，移植后在受体内存活，移植后与周围组织整合成整体，在受体内执行适当的功能，避免对受体的任何伤害，避免免疫排斥反应。总之，人类胚胎干细胞的应用，尤其是干细胞基础疗法的前景很好，但还有重要的技术障碍，尚需通过不懈的努力研究去解决。

4. 利用胚胎干细胞生产克隆动物和转基因动物

胚胎干细胞可提供大量与理想遗传物质完全一致的核供体，以便大批量生产优质克隆动物。胚胎干细胞作为转基因载体要大大优于动物受精卵，无论是外源基因的整合数目、位点、表达以及插入基因的稳定性等都可以在细胞水平上进行加工。目前，已将大鼠、牛、绵羊及人的生长激素基因先后导入小鼠基因组，得到的转基因小鼠在快速生长期（5～11周龄）的生长速度为对照组的4倍。

胚胎干细胞研究的伦理学问题

作为一种全新的治疗手段，细胞治疗和器官移植、胚胎干细胞治疗等一样，都会遇到来自社会各个方面（主要是伦理与法律）的制约与限制。所以应加强科普教育，提高人们对干细胞治疗认识的同时，积极呼吁政府尽快建立相关法规，以指导干细胞研究及应用的具体实施。成体干细胞的研究虽然还处于初级阶段，面临许多困难，其广阔的应用前景已引起全世界的关注。以干细胞工程、基因工程及组织工程相互交叉为特征的干细胞生物工程已成为世界关注的焦点之一。随着21世纪科学技术的飞速发展，干细胞生物工程将取得突破性进展。用干细胞治疗遗传缺陷性和退行性疾病及组织损伤，将引起医学上的又一次革命。

干细胞的研究仅处于起步阶段，对于干细胞的认识了解还存在着许多盲区，想要使设想变成现实，还需要解决很多技术问题。科学家已经掌握了大量的细胞增殖和分化因子并能制造它们。以干细胞为移植的材料来源，未来的研究必须致力于修饰干细胞，减少组织的不相容性。移植器官发育分化的支持体及移植的安全性、由胚胎干细胞在体外发育成如心、肝、肾、肺等大型精密复杂的器官，这些目标还需要技术上的突破。人类干细胞的分离、培养和应用研究可能是人类生命科学研究史上划时代的进步，它几乎涉及所有的生命科学和生物医药学领域。根据细胞分化的多潜能性，多次未分化的增殖细胞按照人们的需要建立细胞库，可作为资源进行细胞替代，用于组织和器官移植、基因与细胞治疗、人体胚胎正常及异常发育生物学、人类新基因的发现和功能基因组学、新药的开发筛选和药效及毒性评价等方面的研究和应用。可以预测，将来各种类型干细胞保存于干细胞库，待需要时取出某种细胞系，用含有细胞因子的培养基按照需要进行培养，从而达到器官移植、治愈疾病的目的。

套用一句改头换面的歌词："时间是怎么样爬过了基因组，干细胞让我们都清楚。"再发挥一点想象力，也许未来的某一天，成年人的每个细胞都可以"年轻化"。也许，人类期待已久的青春重现将不再是梦。

（张金山　赵　洁）

参考文献

[1] Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat Biotechnol, 2008, 26 (11): 1276 - 1284

[2] Aoi T, Yae K, Na kogawa M, et al. Generation of pluripotent stem cell from adult mouse liver and stomach cells. Science, 2008, 321 (889): 699 - 702

[3] Byren jA, pedersen DA, Clepper LL, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. Nature, 2007, 450 (7169): 497 - 502

[4] Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, et al. Reprogramming of murine and human somatic

cells using a single polycistronic vector. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106 (1): 157 - 162

[5] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature, 2009, 457 (7227): 277 - 280

[6] Eminli S, Uktikal J, Amold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. Stem Cell, 2008, 26 (10): 2467 - 2474

[7] Evan MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 1981, 292 (5819): 154 - 156

[8] Gao F, Kwon SW, Zhao Y. PARP1 poly (ADP - ribosyl) ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stem cell differentiation. J Biol Chem. 2009, 284 (33): 22263 - 22273

[9] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminaly differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. Cell, 2008, 133 (2): 250 - 264

[10] Hanna J, Werning M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. Science 2007, 418 (5858): 1920 - 1923

[11] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblast with only Oct - 4 and Sox2. Nat Biotechnol, 2008, 26 (11): 1269 - 1275

[12] Jiang H, Sun B, Wang W, et al. Activation of paternally expressed imprinted genes in newly derived germline - competent mouse parthenogentic embryonic stem cell lines. Cell Res, 2007, 17 (9): 792 - 803

[13] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct - 4 - induced pluripotency in adult neural stem cells. Cell, 2009, 136 (3): 411 - 419

[14] Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature, 2008, 454 (7204): 646 - 650

[15] Lessard J, Sauvageau G. Bmi - 1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. Nature, 2003, 423: 255 - 260

[16] Li C, Yu H, Ma Y, et al. Germline - competent mouse - induced pluripotent stem cell lines generated on human fibroblasts without exogenous leukemia inhibitory factor. PLoS One, 2009, 4 (8): 6724

[17] Li C, Zhou J, Shi G, et al. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human

amniotic fluid – derived cells. Hum Mol Genet. 2009

[18] Li H, Wang B, Yang A, et al. Ly – 1 antibody reactive clone is an important nucleolar protein for control of self – renewal and differentiation in embryonic stem cells. Stem Cells, 2009, 27 (6): 1244 – 1254

[19] Li X, Du Z, Zhang SC, et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. Nature Biotechnol, 2005, 23: 215 – 221

[20] Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell, 2007, 1 (1): 55 – 70

[21] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease – specific induced pluripotent stem cells. Cell, 2008, 134 (5): 877 – 886

[22] Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (23): 13726 – 13731

[23] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson' s disease patient – derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. Cell, 2009, 136 (5): 964 – 977

[24] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K, et al. Reprogramming of pancreatic beta cells into into induced pluripotent stem cells. Curr Bio, 2008, 18 (12): 890 – 894

[25] Stadtfeld M, Naqava M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science, 2008, 322 (5903): 945 – 919

[26] Sun BW, Yang AC, Feng Y, et al. Temporal and parental – specific expression of imprinted genes in a newly derived Chinese human embryonic stem cell line and embryoid bodies. Human Mol Genet, 2006, 15 (1): 65 – 75

[27] Xu H, Wang W, Li C, et al. WWP2 promotes degradation of transcription OCT – 4 in human embryonic stem cells. Cell Res. 2009, 19 (5): 561 – 573

[28] Zhang X, Jin Y. Critical roles of co – activator p300 in mouse embryonic stem differentiation and Nanog expression. J B Chem, 2009, 284 (14): 9168 – 9175

专题6

性别之谜

——性别决定的机制

人类对性别问题的认识经历了一个漫长的过程，直到20世纪初，丹麦人威尔逊和史迪文首次确立了性别决定与染色体的关系，明确提出XX性染色体与雌性对应，而XY性染色体与雄性对应，并提出在性染色体上可能有一种特异的核成分在性别表型中起作用。但随后的近60年，有关性别决定和分化的研究没有任何进展，直到1959年，Jacobs和Wilson分别在*Nature*和*PANS*杂志刊文证明了Y染色体在性别决定中起决定性作用，即Y染色体决定了男性分化，无Y染色体其自然向女性分化。这是一个里程碑式的发现，从这时起，科学家们便把目光集中在这个只传男不传女的小小的Y染色体上，开始了对Y染色体的精细研究，并期待从这里解开性别之谜。在Y染色体是性别决定主导理论的指导下，开展了一系列有关早期胚胎性别发育的研究工作，确立了性别发育大致从下面三个水平展开，即染色体性别、性腺性别和表现型性别。

染色体性别决定

染色体性别在受精时即已决定，即Y染色体决定性别走向。这一点在各种核型异常者中也得到证明，这些核型中多出了一条或多条X染色体，但其表型仍为男性，说明Y染色体决定了男性表型，但是这些男性患者的外生殖器均发育不良，且睾丸不能产生精子。这说明除Y染色体外，X染色体或其他常染色体有可能参与男性表型分化和精子发生。1966年，Jacobs等通过对异常核型性别畸形人的Y染色体结构的分析发现，Y染色体短臂近着丝点处有一个宽泛区域可能存在着指导睾丸分化的基因，随之将其命名为睾丸决定因子，即Testis determining factor。在相隔了近40年后，Sinclair等人于1990年在*Nature*上报道，称在Y染色体短臂的TDF原区段找到了一个只有35kD更小的区段，这一区段足以引起雄性化，并指导睾丸发育。随之，将这一区段命名为Y染色体性别决定区，即SRY。SRY基因的发现是哺乳动物性别决定研究领域的一项重大突破。然而，最近的研究发现，X染色体和常染色体上某些位点的突变也和性逆转有关，这说明还存在另一些性别决定基因。近年来，人们已克隆了许多涉及性别决定的基因。至今为止，在哺乳动物中已分离鉴定了一些性别决定基因（表1）。

表1　在哺乳动物中已发现的性别决定基因

缩　写	基因全称	基因功能
SRY (Sry)	sex - determining region Y	为哺乳动物睾丸决定因子，启动睾丸的分化，是睾丸发育负调节的抑制子
MIH (AMH)	Müllerian inhibiting substance	使雄性体内的副中肾管退化，阻止其发育成雌性生殖器
SOX9	SRY box gene 9	与人类睾丸决定有关，突变可导致产生46XY性反转
WT - 1	Wilms tumor gene 1	可能在性别分化的早期参与SRY的激活

续 表

缩　写	基因全称	基因功能
SF－1	Steroidogenic factor 1	可能是 AMH 基因的直接调控者，是 AMH 基因激活所必需的，在 Sry 表达之前启动性腺和肾上腺的发育
DAX－1	DSS－AHC critical region on the X chromosome，gene 1	决定雌性发育，SRY 仅能抑制其一份剂量
DMRT	Doublesex and mab－3 related transcription factor 1	决定睾丸分化和精子细胞发生
RBM	RNA binding motif	精子细胞发生
DAZ	Deleted in Azooepermia	精子细胞发生
SOX－5	SRY box gene 5	精子细胞发生
SOX－6	SRY box gene 6	精子细胞发生
SOX－17	SRY box gene 17	精子细胞发生

1. SRY **基因**

现已明确 SRY 基因编码的蛋白是一种 DNA 结合蛋白，含有一个典型的 DNA 结合结构域：是由 79 个氨基酸组成的高移动性 DNA 结合区。目前公认的 SRY 基因是 TDF 的最佳候选基因的证据有下面几点：①SRY基因具有高度进化保守性，在其他广泛的物种中也发现了 SRY 同源序列，包括果蝇、两栖类、鸟类、北美鱼等。②定位研究证实 SRY 表达具有明显的时空特异性，小鼠 SRY 在交配后 10.5～11 天表达，此时正好启动睾丸分化，仅仅维持一天即关闭，说明该基因表达在性别决定中起开关功能。③最有力的证据在于转基因动物实验的结果，1991 年 *Nature* 封面文章报道，Koopman 等人将含有 SRY 基因的 14kD 的片段注射到雌性小鼠的受精卵原核中，可使这些雌性小鼠发育为雄性小鼠。④Colvin 等人用基因敲除技术同样证实，雄性小鼠敲除 SRY 基因后，雄性则逆转为雌性，性腺不表达 SRY，睾丸转化为卵巢，外生殖器转化为雌性外阴。

但是也有一些与以上研究完全相反的报道。如：1990 年 *Nature* 上报道了 41 例（46，XY）核型的女性，但其 SRY 呈阳性；而 2006 年另

一篇报道，发现了6例（46，XX）核型的男性，其SRY是阴性。以上事实都说明SRY在性别发生中并非唯一条件，而是由多个基因共同参与的，所以研究者们又开始在X染色体与常染色体上寻找可能的相关基因。

2. X染色体性别决定基因

近年在X染色体也找到几个与性分化相关的基因，较为肯定的有DAX-1，即X染色体剂量敏感性性反转基因。1994年，该基因由Muscatelli等人在*Nature*上首次报道，DAX-1位于X染色体短臂上，属细胞核激素受体超家族成员。当在X染色体上出现双拷贝时，可出现雄性向雌性性逆转，目前认为该基因是一个与SRY起对抗作用的基因，直接影响卵巢的发育。全胚原位分子杂交显示DAX-1特异性表达于早胚发育中卵巢组织，其表达时空与SRY表达基本相同。有趣的是，在转入DAX-1基因雄性小鼠中，雄性完全逆转为雌性，性腺由睾丸逆转为卵巢，外生殖器转化为雌性外阴，提示该基因很可能在雌性性别决定中起重要作用。

2006年，Caper等在*Nat Genet*发表论文，称在X染色体上又克隆到一个新基因R-spondin1，推测它可能是女性性别决定的候选基因，参与了卵巢的形成，并在双性性腺分化早期中起平衡作用。

3. 常染色体性别决定基因

有关性别决定基因的发现近年突飞猛进，相继在常染色体上发现了一系列相关基因，比较明确的有SRY样HMG盒9（SRY-type HMG box 9，SOX9）、Müllerian管抑制物质（Müllerian inhibiting substance，AMH）、甾类生成因子1（Steroidogenic factor-1，SF1）、魏尔门瘤基因-1（Wilms tumor gene，WT-1）等。

Wagner等人在*Cell*上撰文，他们发现位于17号常染色体的长臂上可引起雄性化的一个新基因SOX9，特异性表达于睾丸支持细胞，是SRY下游基因，即在SRY的诱导下表达，并指导睾丸分化，其基因突变可能引起性反转。随后，在*Nat Genet*杂志上发表的转基因动物实验进一步证实，将SOX9基因注射到雌性小鼠的受精卵原核中，生殖嵴上逐渐表达SOX9，并生成睾丸。SOX9基因敲除小鼠发生由雄

性向雌性的逆转，生殖腺嵴不表达 SOX9，睾丸转化为卵巢，外阴变为雌性外生殖器。

AMH 位于人类染色体 19p13.3～13.2，有 5 个外显子，可编码 506 个氨基酸残基的多肽。AMH 是早期胎儿睾丸支持细胞分泌的 560 个氨基酸残基的糖蛋白，为转化生长因子β家族的一员，其主要功能是在雄性个体体内的 Müllerian 管退化，抑制雌性生殖道发生。在未分化性腺中，AMH 的表达在 SRY 表达之后，因此其表达受 SRY 诱导，但并不直接与 SRY 结合，可能在 SF－1 等一些因子的作用下调控表达。它的表达是男性特异性基因转录的最早界标，因此 AMH 启动子可被用来分析 SRY 依赖的男性基因表达通路的活化。在永久性 Müllerian 管综合征（persistent Müllerian duct syndrome，PMDS）患者中，发现了 AMH 基因的突变，他们的社会性别为男性，核性别为 XY，有子宫和输卵管，是一种罕见的男性假两性畸形。在早期的性腺发育中，SF－1 基因使雄性个体体内的激活是必需的，其作用是结合于 AMH 基因的 SF－1 的结合位点上，直接调节 AMH 的表达。SF－1 基因去除可导致小鼠的肾上腺和性腺缺失。

WT－1 是一种肿瘤抑制基因，定位在人类染色体 11p13。WT－1 的 DNA 结合区包含 4 个 Cys2His2 结构，与转录因子的 EGR 家族同源。它的突变导致 Dengs－Drash 综合征：包括儿童肾癌（Wilm's cancer）、肾小球肾病和不同程度的性腺发育异常。某些点突变的杂合子个体除了胚胎起源的肾和性腺缺如外，还引起完全或部分的 XY 性反转。表明 WT－1 可能在性分化早期参与 SRY 的激活。SRY－ORF5′端 4.0kD 处有 1 个 CpG 岛（cytosine phosphorothioate guanine island），可能是 WT－1 基因潜在识别位点。WT－1 基因在生殖腺嵴向睾丸分化时表达，有抑制细胞分裂和诱导细胞分化的功能，并与间质细胞和生精小管分化形成有关。WT－1 编码 1 个转录因子，剔除该基因的小鼠缺乏性腺，但它对性腺发育的影响可能从属于 1 个依赖 SF－1 的途径。

性腺性别决定

性腺性别决定是指在胚胎发育早期，在 Y 染色体指导下，未分化性腺发育为睾丸或卵巢的过程。胚胎的遗传性别虽在受精时已由受精卵的核型确定，但直到胚胎第 7 周，生殖腺才能分辨出是睾丸还是卵巢，而生殖道及外生殖器的性别分化时间更晚。在胚胎早期，男性和女性的生殖系统原基完全相同，经过性分化发育后才形成男性生殖系统和女性生殖系统。

1. **生殖腺的发生**

当受精卵完成植入后，早期胚胎发生过程中原始生殖细胞的出现是启动性别分化的关键。人胚发育的第 3 周，在靠近尿囊根部的卵黄囊内胚层内，出现许多个大而圆并能游走的原始生殖细胞（PGC），定向生殖腺嵴迁移，大约在第 6 周完成迁移。目前认为诸多影响 PGC 形成的因子中，Fragilis 是最关键的因子，该因子是 stella 基因的产物，可作为生殖干细胞特异性标志物。PGC 在迁移过程中不断进行分裂增殖。影响迁移的因子有很多，最为肯定的是基质细胞衍化生长因子（SDF－1）及其受体（CXCR4b），该生长因子特异性表达于 PGC 及其迁移路线，过高表达或抑制其表达将影响 PGC 准时到达生殖腺嵴。与原始生殖细胞迁移的同时，靠近胚体尾侧，原始消化管背系膜与中肾嵴之间出现纵行隆起，即生殖腺嵴，由体腔上皮和下方中胚层细胞增生聚集而成。不久，生殖腺嵴表面的体腔上皮向其下方的间充质生出许多不规则的细胞索，称初级性索。此时的性腺处在未分化阶段。

2. **睾丸的发生**

若胚胎的核型含有 Y 染色体，未分化性腺则向睾丸方向分化。人胚第 7 周，初级性索增殖并与表面上皮分离，在生殖腺嵴深部发育为睾丸索，由此分化为细长弯曲的袢状生精小管。此时，生殖上皮下陷并脱离形成生精小管，并演化为睾丸的支持细胞，迁入的 PGC 分化为精原细胞，生精小管之间的间充质细胞分化为间质细胞。从第 8 周开始，间

质细胞开始分泌睾酮，诱导男性生殖道及外生殖器发育。

3. **卵巢的发生**

若胚胎的核型不含 Y 染色体，其未分化性腺则自然分化为卵巢。卵巢的分化比睾丸晚。人胚第 10 周，初级性索向深部生长并形成不完善的卵巢网。随后，初级性索与卵巢网都退化，被血管和基质所替代，成为卵巢髓质。此后，生殖腺嵴表面上皮又形成短的新细胞索，称次级性索或皮质索。约在人胚第 16 周时，皮质索断裂成许多孤立的细胞团，形成原始卵泡。每个原始卵泡的中央是一个由 PGC 分化而来的卵原细胞，周围是一层由皮质索细胞分化而来的小而扁平的卵泡细胞。表面上皮下面的间充质分化形成薄层结缔组织白膜，卵泡之间的间充质则分化形成卵巢基质。

4. **生殖道的发生**

人胚第 6 周时，男女两性胚胎在生殖腺嵴的背侧均具有两套生殖道，一条是向男性方向发育的中肾管，另一条则是向女性方向发育的 Müllerian 管，此时的人胚是双性的。随后，若生殖腺分化为睾丸，其睾丸支持细胞分泌 AMH 促使 Müllerian 管退化，阻断了向女性方向的分化。此时睾丸间质细胞分泌的睾酮使中肾管向男性进一步发育，演化成男性内生殖道，如附睾的输出小管、附睾管、输精管、精囊及射精管。若生殖腺分化为卵巢，男性的中肾管由于缺乏雄激素而退化，无 AMH 的抑制作用，Müllerian 管进一步向女性内生殖道发育。两侧 Müllerian 管的上段和中段演化为输卵管，下段融合成子宫和阴道穹隆部。

表现型性别阶段

表现型性别阶段，则是指胚胎发育后期及出生后，在睾丸或卵巢激素的影响下，内外生殖器官发育。

1. **性别表型的激素调节**

表现型性别阶段受到睾丸或卵巢分泌激素的调控。雄性或雌性个体的表现型性别决定有两个阶段：其一为胚胎的器官形成阶段，其二为青

春期。胚胎早期，若将未分化性腺去除，个体呈雌性表型。中肾旁管在中肾管退化后迅速分化发育。这类情况在先天无功能性性腺的人身上也可看到。某些个体只有一条X染色体（无Y染色体），这些个体有卵巢，但卵巢在出生前萎缩，且生殖细胞也会在青春期之前死亡。然而，由于一开始受到从卵巢分泌而后是母体或胎盘分泌雌激素的影响，这些婴儿在出生时都具有女性生殖道。雄性表型的形成涉及了睾丸激素的分泌，睾丸激素促进中肾管形成并引致中肾旁管退化。其中由支持细胞AMH导致中肾旁管萎缩退化；由间质细胞分泌的睾酮促进中肾管分化为附睾、输精管、精囊，并使生殖结节细胞增殖生成阴茎。这两套独立的雄性化激素系统在雄激素非敏感综合征（Androgen insensitivity syndrome）患者中得到证实。这种XY个体具有睾丸决定因子，发育完全的睾丸可产生睾酮和AMH。然而，这种患者缺乏睾酮受体蛋白，因而不能对自身产生的睾酮起反应。他们从外表看起来为女性，具有睾丸，亦可对AMH产生反应，但中肾旁管退化。这些个体可以像女性一样发育却因为缺乏子宫和输卵管而不能生育。

2. 中枢神经系统调节

对表现型性别决定机制具有重要意义的一个方面就是性特异行为的培养。在幼鸟中，睾酮可以调节雄性大脑雄性特异性神经细胞群生长，雄性金丝雀和斑纹燕雀的叫声要比雌鸟雄壮有力，这些叫声是用来规划活动区域和吸引配偶的。鸟类大脑中有6种不同的神经细胞群来调节“叫”的能力，且这些不同区域的神经元互相联系。雄性金丝雀这些区域的神经元的数量是雌鸟的数倍，而在雌性斑纹燕雀这些区域完全缺失。睾酮在鸟鸣产生中起到关键性的的作用。Prove证实，成年雄性斑雀鸟鸣声音音量的大小与血清睾酮浓度有一定线性联系。业已证实这些鸟类季节性的音频变化也与其血清睾酮季节性变化有关，当睾酮水平较低时，不仅鸟的叫声会降低，雄性特异性大脑核团也会缩小。阉割苍头燕雀的睾丸叫声随之消失，而注射睾酮会诱发这些鸟在11月份鸣叫，而正常情况下这一时期不鸣叫。在几种类型鸟类中，给雌鸟注射睾酮时，可以诱发它们鸣叫，控制这些鸟鸣叫的大脑4个区域神经元的数量增长了50%~69%，而其他区域无此变化。很显然，性激素在引发神经

系统性特异行为区域神经元的发育中起到了重要作用。

有关哺乳动物的情况目前还不清楚，因为还没有绝对的性别特异行为。大鼠的阴茎插入是雄性特有的行为，它受控于提睾肌和球状海绵体肌的运动神经元。支配这两种肌的神经元源自脊髓核团均可特异性产生睾酮。在雌性大鼠中，这些肌群已经退化，控制这些肌的神经元数量也大大减少。睾酮似乎引起这些反应性神经元两种类型的变化，处在胚胎时期和新生的大鼠睾酮可阻止这一区域神经元的死亡。雌性大鼠脊髓核团神经元丢失达 75%，而雄性大鼠仅丢失 25%。在成年大鼠中，睾酮作用于这些核团并维持这些神经元及其树突的大小。当成年大鼠被阉割后，这些神经元的数量和树突的长度减少一半以上，注射睾酮后可逆转这一变化。在人类中，不同性别间生长率的差异仅有细微的解剖学上的差异。虽然人类女性的大脑比男性小 10%，但在某些皮层区颗粒细胞层含有比男性更多的包裹密集的神经元。

睾酮并非是唯一调节行为的甾类化合物。在哺乳动物，雌激素敏感性神经元定位于下丘脑、垂体和杏仁核，业已明确这些神经元与生殖行为的调控有关。Pfaff 和 McEwen 证实雌激素可改变下丘脑神经元电化学特性，而这些可结合雌激素到其染色质上。Terasawa 和 Sawyer 很早就注意到大鼠下丘脑神经元随其季节性雌激素周期而发生电活动变化，并在排卵期电活动加强。另外，雌激素可以刺激这一区域的神经元并诱导雌性生殖行为。将雌激素直接注入卵巢切除大鼠的下丘脑，受试雌性大鼠出现脊柱前凸，这一动作刺激雄性大鼠爬背性交，而对照组雄性大鼠不出现此动作。据信此时雌激素所致下丘脑神经元特异性活动是通过对 Na^+ 的通透性增加来实现。

前面谈到的多数实验资料均来自低等生物，因此无法完全指导对高等生物的研究。所以对人类性别决定与分化机制的研究，以及临床上常见的生殖系统畸形，真性或假性两性畸形，及社会性别变异，如性逆转、变性人、同性恋等的认识我们还不清楚，尚需走很长的一段历程。

（李　臻）

参考文献

[1] 程汉华，周荣家. 早期胚胎的发育选择：性别决定. 遗传，2007，29（2）：145－149

[2] 陈吉龙. 发育生物学进展. 北京：高等教育出版社，1994

[3] 丁汉波. 发育生物学. 北京：高等教育出版社，1987

[4] 樊启利，白书农. 发育生物学原理. 北京：高等教育出版社，2002

[5] 高建军，高泽霞，王卫民. 鱼类性别决定及性别特异性分子标记的研究进展. 水产科学，2010，29（7）：432－437

[6] 龚军辉. 环境与性别分化（二）. 高等函授学报. 自然科学版，2005，19（3）：48－49

[7] 桂建芳，易梅生. 发育生物学. 北京：科学出版社，2002

[8] 贺斌，史海涛，廖广桥. 龟鳖类温度依赖型性别决定机制的研究进展. 动物学杂志，2009，44（5）：147－152

[9] 贾存灵，魏泽辉. 鸡性别决定机制的研究进展. 中国家禽，2010，32（1）：43－46

[10] 李云龙. 动物发育生物学. 济南：山东科技出版社，2005

[11] 牛宝龙，翁宏飚，孟智启. 昆虫的性别决定与性别控制. 浙江农业学报，2001，13（6）：327－334

[12] 刘厚奇，蔡文琴. 医学发育生物学. 北京：科学出版社，2007

[13] 刘维瑜，金春莲. 人类性别决定相关基因的研究进展. 国外医学遗传学分册，2005，28（5）：262－267

[14] 楼允东，刘艳红，邱高峰. 虾蟹类性别决定研究进展. 上海水产大学学报，2004，13（2）：157－163

[15] 田佳，陈公，王艺磊，等. 鱼类性别决定的影响因素. 生命科学，2010，22（10）：971－977

[16] 袁孝军. 哺乳动物性别决定机制的研究进展. 生物学通报，2010，45（1）：8－12

[17] 张红卫. 发育生物学. 北京：高等教育出版社，2001

[18] 张秀华，井长勤. 哺乳动物性别决定基因的研究进展. 新乡医学院学报，2006，23（6）：638－640

[19] 张勇，陈淳，顾建新，等. 哺乳动物性别决定的研究进展. 生物工程进展，200，

21 (3): 26 - 30

[20] 周林燕，张修月，王德寿. 脊椎动物性别决定和分化的分子机制研究进展. 动物学研究，2004，25 (1): 81 - 88

[21] Arias AM, Stewart A. Molecular principles of animal development. Oxford: Oxford University press, 2002

[22] Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Mullerlan - inhibiting substance function during mammalian sexual development. Cell, 1994, 79: 415 - 425

[23] Bartsch G, Rittmaster RS, Klocker H. Dihydrotestosterone and the concept of 5alpha - reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. European Virology, 2000: 367 - 380

[24] Wilcox CH. 英研究人员发现雌雄同体鸡性别决定机制. 农业生物技术学报，2010，18 (3): 544

[25] Gilbert SF. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 6th ed. Developmental biology, 2000

[26] King WS, Cummings MR. Essentials of genetics. 4th ed. Beijing: Higher Education Press and Pearson Education, 2002

[27] Leland H. Genetics: from genes to genomes. New York: MicGraw - Hill Companies, Inc, 2000

[28] Raymond CS, Shamu CS, Shen MM, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex - determining genes. Nature, 1998, 391: 691 - 695

[29] Rnymond CS, Kettlewell R, Hirsch B, et al. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. Development Biology, 1999, 215: 208 - 220

[30] Smith CA, McClive PJ, Western PS, et al. Conservation of a sex - determining gene. Nature, 1999, 402: 601 - 602

[31] Twyman RM. Instant notes in developmental biology. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 2001

[32] Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. Physiological Reviews, 2007, 87: 1 - 28

[33] Wolf U. Reorganization of sex - determining pathway with the evolution of placentation. Human Genet, 1999, 105: 288 - 292

[34] Wolpert L. Principles of Development. Oxford: Oxford University Press, 2002

专题 7

隐形战士

——信号分子对生长与发育的调控

信号分子概述

人类很早以前就有探索微观世界奥秘的要求，但是苦于没有理想的工具和手段。1590 年，荷兰眼镜制造商 J. Jaen 和 Z. Jaen 父子制作了第一台复式显微镜，尽管其放大倍数不超过 10 倍，但具有划时代的意义。1665 年，英国人 Robert Hooke 用自己设计与制造的显微镜观察了软木（栎树皮）的薄片，第一次描述了植物细胞的构造，并首次用 cells（小室）这个词来称呼他所看到的类似蜂巢的极小的封闭状小室（实际上只是观察到植物细胞的细胞壁）。在此后的研究中，他还用显微镜研究了动物的受精作用。首先将显微镜运用到医学领域的是意大利人马尔皮基（Marcello M，1628—1694），他把显微镜用于生物物体组织结构的观察。显微镜的发明翻开了生物学和医学研究的新篇章，它使研究者们从细胞、亚细胞的形态结构上了解了细胞如何生长、发育及发挥正常生理功能；在异常病理状态下还有助于阐明疾病的发生、发展及转

归的规律，进而衍生了病理学。毫不夸张地说，正是因为显微镜在生物学和医学研究中的广泛运用，使人们得以深入观察物体的微细结构，从而促进了近代组织学、微生物学、胚胎学、细胞生物学和病理学的建立和发展。

随着现代生物科学的不断发展，越来越多的研究者们意识到虽然人体内的细胞种类繁多，各类细胞的形态、功能差异很大，但是从维持人体整体功能的角度来说，很多细胞之间又是互相联系、密不可分的。例如，性激素可以影响骨骼的发生与化学组成，但直到最近，学者们才发现，骨骼也可以反过来作为调节雄性动物生殖功能的重要内分泌器官。Dr. Karsenty 实验组将成骨细胞与原代培养间质细胞或小鼠睾丸组织共培养，成骨细胞可以明显诱导后两者的睾酮产量；类似的，骨钙素敲除小鼠睾酮水平急剧降低，生精细胞死亡数量增加；进一步研究发现，骨钙素可以与间质细胞上的 G 蛋白耦联受体结合，通过调节 cAMP 反应元件结合蛋白的方式干扰睾酮合成时所需限速酶的产量，从而促进精子发生过程。上述结果开启了骨骼作为雄性动物生殖调节内分泌器官的研究新起点。近年来，随着我国社会经济条件的改善，人民生活水平的不断提高、饮食结构的改变、劳动强度的减低，人群平均寿命延长，应激状态增多，1 型和 2 型糖尿病在我国的发病率和患病率急剧升高。2008 年完成的一项能够代表全国 20 岁以上成人糖尿病患病率的调查显示，我国糖尿病患病率已经高达 9.7%。也就是说每 10 个成人中约有 1 个糖尿病患者，糖尿病已成为危害人类健康的重大社会问题。1 型糖尿病（胰岛素依赖型糖尿病）多发生在儿童和青少年，起病比较急剧，体内胰岛素分泌量绝对不足，容易发生酮症酸中毒。在 1 型糖尿病患者的血液中可查出多种自身免疫抗体，如谷氨酸脱羧酶抗体（GAD 抗体）、胰岛细胞抗体（ICA 抗体）等。这些异常的自身抗体可以损伤人体分泌胰岛素的胰岛 β 细胞，使之不能正常分泌胰岛素。最新研究显示，$CD8^+$ T细胞的异常激活及反应性增高是引发 1 型糖尿病患者胰岛 β 细胞被大量破坏的关键因素。该研究为深入研究胰岛细胞自身免疫反应提供了重要线索，并且强调了发病过程中的异质性和长期性。以上例子充分说明，体内不同种细胞之间的相互作用对于正常生理功能的发挥，以

及某些异常病理发生具有重要意义。

生物体内细胞所处位置千差万别、有远有近，为了能够及时协调相互之间的作用，就需要存在信息传递分子，即信号分子（signaling molecules），后者指生物体内的某些化学分子，既非营养物，又非能源物质和结构物质，而且也不是酶，它们主要是通过与细胞特异性受体结合，进而在细胞之间传递信息，将体内纷繁复杂的细胞构成一个功能统一体。在一定条件下，细胞外的化学信号能引发细胞的定向移动。这些信号有些时候是物质表面上的一些难溶物质，有些时候则是可溶物质。信号分子有很多，可以是肽、代谢产物、细胞壁或是细胞膜的残片，信息分子的作用是与靶细胞的受体结合，改变受体的性质和作用，完成一系列的反应，去激活或抑制肌动蛋白结合蛋白的活性，最终改变细胞骨架的状态。细胞膜上的受体可感受到那些被称为化学趋向吸引物（chemotactic attractant）的物质，并且逆着它们的浓度梯度去追根寻源。某些信号分子甚至会影响细胞移行的速度，这些信号分子则被称为化学趋向剂（chemokinetic agent）。细胞这种因化学分子改变自己移动的行为，被称为化学趋向性。例如盘基网柄菌会逆着 cAMP 的浓度梯度运动。白细胞也会受到一些细菌分泌的三肽化学物质 f－Met－Leu－Phe（N－甲酰蛋－亮－苯丙氨酸）吸引而往细菌移动，发挥其免疫功能。而在胚胎发生中的神经嵴细胞则并非靠浓度梯度，而是靠路标物质识别其去向。细胞外信号种类繁多，但是当它们与细胞膜上受体结合之后，在细胞内的作用途径却只有几种，如在细胞迁移过程中，上述的 G 蛋白耦联系统就被激活，进而活化下游通路。以信号分子为主体的细胞信号传导系统具有调节细胞增殖（cell proliferation）、分化（cell differentiation）、代谢（metabolism）、应激（stress）、防御（defense）和凋亡（apoptosis）等重要作用。细胞的一切生命活动都与信号转导有关，信号分子是一切生理活动的始动因素。

信号分子类型及作用特点

细胞信号通过受体或类似于受体的物质激活细胞内的信号转导通路，触发离子通道的开放、蛋白质（protein）可逆磷酸化反应以及基因（gene）表达改变等变化，进而导致一系列生物效应。不同的信号转导通路间具有相互的联系和作用，形成极其复杂的网络，主要包括物理信号、化学信号和生物信号。

1. **物理信号**（physical signal）

物理信号包括光、声波、电信号、辐射、压力、渗透压和牵张力等。如热刺激、细胞容积和渗透压改变等刺激能够引起某些离子通道（ion otropic）的生化性质改变，进而诱发信号传递；细胞骨架组成的重要结构物质黏附分子（adhesion molecule，AM）能够感受细胞外基质某些机械和细胞运动刺激传递的信号；视网膜上存在特殊的光敏细胞——视杆细胞，含有丰富的视紫红质，当光线作用于视紫红质，使G蛋白转导素（G protein transducine，GPT）解离，改变第二信使环磷酸鸟苷酸（syclic guanosine monophosphate，sGMP）的含量，最后以细胞膜上的电兴奋形式将信号传递至视觉中枢，从而产生视觉。

2. **化学信号**（chemical signal）

化学信号主要包括激素（hormone）、神经递质（neurotransmitters）和局部代谢产物（local mediators）等。激素是由内分泌细胞（如肾上腺、睾丸、卵巢、胰腺、甲状腺、甲状旁腺和垂体）合成的化学信号分子，一种内分泌细胞基本上只分泌一种激素，参与细胞通讯的激素有三种类型：蛋白与肽类激素、类固醇激素、氨基酸衍生物激素。激素主要通过血液循环系统作用于全身靶器官、靶组织和靶细胞，是最广泛的一种信号转导方式。在动物中，产生激素的细胞是内分泌细胞，所以将这种通讯称为内分泌信号（endocrine signaling）。神经递质是由神经末梢释放出来的小分子物质，是神经元与靶细胞之间的化学信使。由于神经递质是神经细胞分泌的，所以这种信号又称为神经信号（neuronal

signaling)。某些神经内分泌细胞与靶细胞为同一细胞，细胞分泌的化学信号物质与该细胞表面膜上的受体结合介导相应的细胞反应，这种反应方式被称为自分泌信号（autoerine）；有些神经递质和神经肽、细胞生长因子，以及局部化学介质，如前列腺素（prostaglandin，PG）被分泌到细胞外后，很快被摄取、吸收、分解或破坏，因此，只能对局部的靶细胞起作用，称为旁分泌信号（paracrine），神经元之间的突触传递就是典型的旁分泌形式。局部代谢产物是由各种不同类型的细胞合成并分泌到细胞外液中的信号分子，它只能作用于周围的细胞。所以通常这种信号转导属于旁分泌信号。有时这种信号分子也作用于分泌细胞本身，如前列腺素是由前列腺合成分泌的脂肪酸衍生物（主要是由花生四烯酸合成的），它不仅能够控制邻近细胞的活性，也能作用于合成前列腺素的细胞自身。化学信号又被称为配体（ligand），除了上述三种以外，还包括：体液因子、气味因子、细胞代谢产物（如三磷酸腺苷酶、活性氧等），以及进入体内的药物（如细菌毒素在内的毒物）等。

3. **生物信号**（biological signal）

生物信号主要是指生物大分子的结构所蕴含的信号，蛋白质的氨基酸（aminoacid）序列决定蛋白质的三维结构，进而决定了蛋白质的功能。细胞之间或细胞与细胞外基质之间通过膜结合分子进行相互识别与结合/黏附，这是细胞间信息交流或称细胞通讯最直接和原始的方式。例如睾丸支持细胞（sertoli cell）通过调节其与相邻生精细胞之间的紧密连接、缝隙连接、中间连接等相互作用结构，在生精细胞从生精小管基底部向管腔部移动、分化过程中起着重要的信号调控作用；已知通过敲除这些连接结构上的特异性基因，可以引起精子发生阻滞于不同阶段，提示支持细胞与生精细胞之间的信号通讯对于正常精子发育分化具有重要意义。黏附分子是参与细胞黏附（cell adhesion，CA）、迁移（transition）的关键媒合。AM参与了炎症进程中白细胞浸润，肿瘤细胞的侵袭、转移等重要的病理过程。细胞外基质中的纤维连接蛋白（fibronection Fn）、层粘连蛋白（laminin，Lm）、胶原蛋白（collagen）等细胞间质分子不仅起到支撑、填充的作用，而且对于调节细胞的生长分化、细胞迁移、凋亡和细胞间的功能协调起着重要的作用。

信号分子受体类型及作用特点

受体指任何能够同激素、神经递质、药物或细胞内的信号分子结合并能引起细胞功能变化的生物大分子，它在细胞膜上或细胞内能识别生物活性分子并与之结合，能把识别和接收的信号正确无误地放大并传递到细胞内部，进而引起生物学效应。在细胞通讯中，由信号传导细胞送出的信号分子必须被靶细胞接收才能触发靶细胞的应答，接收信息的分子称为受体，此时的信号分子被称为配体（ligand）。受体与配体的结合有一定的特异性，有人将其形容为“钥匙和锁”（key and lock）的关系。配体与受体的结合是一种分子识别过程，它靠氢键、离子键与范德华力的作用，随着两种分子空间结构互补程度增加，相互作用基团之间距离就会缩短，作用力就会大大增加，因此分子空间结构的互补性是特异性结合的主要因素。同一配体可能有两种或两种以上的不同受体，例如乙酰胆碱有烟碱型和毒蕈碱型两种受体，同一配体与不同类型受体结合会产生不同的细胞反应。如 Ach 可以使骨骼肌兴奋，但对心肌则是抑制的。受体与配体结合的特异性是受体的最基本特点，保证了信号转导的正确性。特异性除了可以理解为一种受体仅能与一种配体结合之外，还可以表现为在同一细胞或不同类型的细胞中，同一配体可能有两种或两种以上的不同受体；同一配体与不同类型受体结合会产生不同的细胞反应，例如肾上腺素作用于皮肤黏膜血管上的 α 受体使血管平滑肌收缩，作用于支气管平滑肌等使其舒张。此外，受体作用还具有亲和性、可逆性、阻断性以及饱和性等特点。

从各种信号刺激导致的结果，即细胞行为变化来说，细胞信号转导分类如下：①细胞分裂、分化信号，使与脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）复制相关的基因表达，调节细胞周期，使细胞进入分裂和增殖阶段；使细胞内的遗传程序有选择地表达，从而使细胞最终不可逆地分化成为有特定功能的成熟细胞。②细胞代谢功能信号，使细胞摄入并代谢营养物质，提供细胞生命活动所需要的能量，促使细胞释放

神经递质或化学介质等，并进行正常的功能活动。③细胞凋亡信号，为了维护多数细胞生物的整体利益，在局部范围内和一定数量上发生细胞的利它性自杀死亡。

机体不仅通过改变激素的浓度以适应生理需要，也可以通过改变激素受体的密度，从而改变靶细胞的敏感性，来改变某种生理功能。因此，仅仅测定激素的浓度，还不能反映内分泌功能的全貌，还应测定激素受体的密度及靶细胞的反应性。近年来，受体学说在临床上也得到了广泛应用。“受体病”就是一个应运而生的新概念。受体病是由于受体的数量和质量发生了异常改变而引起的一种病理状态。如非胰岛素依赖型糖尿病就是一个典型例证。这种患者对外源性胰岛素不敏感，用通常的注射胰岛素的方法治疗，很难奏效。受体作为一种蛋白质，具有抗原性。在某种情况下通过自身免疫机制，可以产生抗受体的抗体。在极度耐胰岛素的2型糖尿病患者中，有抗胰岛素受体的抗体；在重症肌无力患者中，有抗乙酰胆碱受体的抗体。它们竞争性地抑制了激素或递质与其受体结合，干扰了其正常作用的发挥。

受体研究是从分子水平来阐明激素、递质、药物、抗体的作用机制及生理和病理过程的，因此，它已成为科学技术的前沿阵地之一。

几类重要的信号分子及其信号通路

1. FSH和AR信号通路在精子发生过程中的调节作用

雄激素信号通路对精子发生过程至关重要，一方面它维持原始性腺朝着睾丸方向发育；另一方面它是精子发生的始动因素，从青春期开始大量分泌，促进并维持精子发生过程的正常进行。已知支持细胞上表达雄激素结合蛋白（androgen binding protein，ABP），后者可以使小鼠生精小管内雄激素浓度维持于高水平，当小鼠生精小管内雄激素浓度降低到20ng/ml水平时将会显著减少成熟精子形成；临床上很多精子发生障碍的患者其血清中睾酮水平显著降低，所以目前针对雄激素水平的检测已成为诊治男性不育症的常规手段。在睾丸内，雄激素受体主要分布于

间质细胞、支持细胞和管周肌样细胞。大量数据表明，敲除这三类细胞上的任何一个 AR 均可导致小鼠不育，说明间质细胞、支持细胞和管周肌样细胞上分布的 AR 及其介导的雄激素信号通路对精子发生非常重要。除雄激素信号通路外，精子发生过程还受 FSH 信号通路调节，支持细胞特异性表达 FSH 受体；支持细胞在 FSH 作用下产生雄激素结合蛋白（ABP）与睾酮结合，从而增强雄激素在生精小管内的浓度。FSH 是唯一能够启动支持细胞产生 cAMP 的因子，cAMP 水平受 FSH 调控，FSH 由此而间接调节生精细胞的分裂和分化。此外，在某些伤害性刺激作用于睾丸时，FSH 水平会异常升高，所以临床上已将血清 FSH 水平检测作为男性不育患者的常规检测指标之一。具体说来，AR 受体和 FSH 受体都存在于支持细胞上，AR 信号通路与 FSH 信号通路主要通过以下几种方式调节精子发生过程。

（1）在胚胎期初级性索形成阶段，支持细胞将生精细胞锚着于原始生精上皮并抑制其进入减数分裂，如果这一过程不能准确实现，未锚定的原始生殖细胞将会进入减数分裂阶段进而朝卵细胞方向分化，所以这一锚定作用是雄性生殖细胞发育的起始信号。在这一过程中，Y 染色体上的性别决定基因（SRY）发挥了重要的调节作用。在睾丸形成之后支持细胞与各级生精细胞迅速开始增殖，支持细胞于生后青春期停止有丝分裂，这也就意味着成年睾丸支持细胞的数量主要在青春期前就已决定下来了。相邻支持细胞停止增殖后，互相之间可以形成紧密连接（tight junction），从此也就开始了对精子发育过程的精细调控。

（2）在精子发育过程中，支持细胞能够分泌合成多种物质，对周围的各级生精细胞起到重要的营养调节作用，这些营养物质有助于各类连接的形成、血生精小管屏障的形成以及生精细胞之间的相互作用。根据其生化性质，这些营养物质可分为：第一类具有转运和生物保护功能的蛋白，比如转铁蛋白（transferrin）和 ceruloplasmin，由于功能非常基础，它们的合成量相当巨大；第二类分泌性蛋白，包括蛋白酶和蛋白酶抑制剂，这类蛋白在精子形成过程（spermiogenesis）中前细线期精母细胞（preleptotene spermatocyte）朝管腔中心移动时发挥重要的基质重建功能；第三类糖蛋白，主要分布于支持细胞与基底管周肌样细胞之

间，支持细胞分泌很多低浓度的糖蛋白，主要对精子发生过程起关键性的调节作用，这些糖蛋白可以以生长因子、旁分泌蛋白（如苗勒管抑制物质 müllerian inhibiting proteins、MIS 和 inhibin）或代谢营养物的形式释放入管腔。

（3）有大量数据表明支持细胞对生精细胞发育的关键性调控作用，比如截至目前还未见有只有生精细胞存在的生精小管的报道，体外培养实验中缺乏支持细胞共培养的生精细胞，很难像在体内环境中那样发生分化。早期研究者们只认识到支持细胞的功能状态对于生精细胞的数量非常关键，也即决定了生后精子产生的潜力，但是后来发现支持细胞的功能状态对于不同生长阶段的生精细胞分化成熟也同样重要，而且细胞分化程度不同对支持细胞的依赖性也不同，一般来讲，分化越成熟的生精细胞（比如长形精子细胞）对支持细胞功能的完整性要求越高。

（4）维生素结合蛋白、雄激素结合蛋白（androgen binding protein，ABP）、抑制素（inhibin）、转化生长因子、胰岛素样生长因子、神经生长因子（nerve growth factor，NGF）、层粘连蛋白（laminin）、Ⅳ型胶原蛋白等，这些分泌产物的出现是生精细胞与支持细胞以及支持细胞之间发生相互作用的物质基础，其数量与功能的异常往往会诱发精子发生障碍；同时，当睾丸组织遭遇不同伤害刺激时，这些物质又可作为信息传递分子，参与支持细胞对生精细胞的保护调节作用。

（5）相邻支持细胞之间形成的紧密连接是血生精小管屏障的重要组成之一，后者可把曲细精管的上皮分隔为基底部与管腔部，在基底部的生精细胞较为幼稚，可以与血液直接接触，各种营养物质（如促性腺激素、性激素、糖、脂肪酸、氨基酸等）可以通过基膜直接供给基底部的生精细胞，但是一些高分子物质（如白蛋白、胆固醇等）难以到达管腔部；血生精小管屏障的存在可防止精母细胞和精子抗原与体内的免疫系统接触，是保证生精细胞在进入减数分裂阶段后能有一个相对独立而稳定的发育环境，对精子发生过程至关重要。此外，最新的研究显示，支持细胞－生精细胞的接触作用对生精细胞的发育分化至关重要，例如利用 AF－2364 干扰大鼠睾丸中支持细胞－生精细胞的锚定连接（anchoring junction）可直接诱导大量生精细胞凋亡进而导致精子发

生障碍；在体外利用支持细胞-生精细胞共培养系统，已经证实支持细胞可以通过调节周围生精细胞的凋亡过程来间接干预精子发生过程，尤其在睾丸受到外源性伤害性刺激时，有利于受伤生精细胞的清除，维持睾丸内环境的稳定。

FSH与AR信号通路同为调控精子发生的重要信号通路，两者在作用方式上具有某些共性，比如FSH和睾酮分别可以独立地刺激处于青春期的支持细胞的增殖，但是前者效果更强一些；这一刺激作用很可能是激活MAP激酶（MAPK）通路后的结果。FSH和睾酮都可以诱导ERK激酶的磷酸化，但是前者对CREB磷酸化的诱导作用是后者的2倍多，提示除MAPK以外还有其他的调节因子参与了对支持细胞增殖状态的调控。FSH与AR信号通路在睾丸中的作用各自也具有明显的特点，比如只有睾酮可以单独维持精子发生过程的进行，但是它却不能像FSH一样上调支持细胞中cAMP的产量。此外，FSH可以调节PI3-K和PLA2信号通路但是睾酮却未见报道。越来越多的研究者认为，FSH与AR信号通路可能互为补充进而组成一个完善的交叉作用网络，共同发挥控制精子发生过程的作用。

2. PKB/Akt信号通路在心肌细胞损伤中的作用

细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育、维护内环境稳定及多基因控制的细胞主动死亡过程。它既是一种重要的生理性调节机制，也参与很多病理过程。研究发现，动脉粥样硬化及再狭窄、充血性心力衰竭、心肌缺血再灌注损伤、心律失常和心肌病等多种心血管疾病的发生、发展均与细胞凋亡现象有关。蛋白激酶B（PKB/Akt）是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，因其激酶活性区的氨基酸组成与蛋白激酶A（protein kinase A，PKA）和蛋白激酶C（protein kinase C，PKC）高度同源（同源性分别为68%和73%）而得名。PKB是磷脂酰肌醇3-激酶（phosphoinositide 3-kinases，PI3-K）主要的下游信号传递途径，能通过依赖PI3-K的途径被白细胞介素-3（interleukin-3，Ⅱ-3）、血小板源性生长因子（platelet—derived growth factor，PDGF）和胰岛素样生长因子-1（insulin-like growth factor-1，IGF-1）等多种生长因子和细胞因子活化，活化的PKB能传递抑制凋亡的生存信号。大量研

究揭示，PKB 在心肌细胞凋亡中起负性调节作用。在乳鼠心室肌细胞中有促红细胞生成素受体（erythropoietin receptor，EPOR）的表达，当乳鼠心室肌细胞缺氧时，用重组人类促红细胞生成素（re－combination human erythropoietin，hEPO）可减少凋亡，在冠状动脉缺血大鼠中早期使用促红细胞生成素（erythropoietin，EPO）也可减少缺血区心肌细胞的凋亡。EPO 是通过依赖于 PKB 的途径抑制凋亡；神经生长因子（nerve growth factor，NGF）也是通过 PI3－K/PKB 信号通路使caspase－3 和 caspase－9 失活而抑制凋亡。IGF－1 在缺氧诱导的乳鼠心肌细胞凋亡中起抑制作用，此作用伴随着依赖于 PI3－K 途径的 PKB 和 Bad 的磷酸化。此外，PKB 还可通过磷酸化促凋亡蛋白抗心肌细胞凋亡：Bad 是 Bcl－2 家族成员，能和 Bcl－2 家族另一成员 Bcl－2 或 Bcl－XL 形成异二聚体，从而促进细胞凋亡，但 Bad 磷酸化后其促进凋亡的作用则受抑制。许多实验表明，Bad 是 PKB 的直接底物，通过生长因子传递生存信号而发挥抑制凋亡作用，其促进细胞凋亡作用被 PI3－K/PKB 信号通路调节。NF－κB 是一种多向性转录因子，由 p50 亚基和 RelA/p65 亚基组成，参与不同的生物调节。它是心脏基因表达的重要调节者，这些基因在不同的生理和病理状态下编码下游许多信号转导级联。NF－κB 的调节是复杂的，除了被常见的细胞因子介导通路激活外，还被许多与心肌肥大发展和氧化应激反应有关的信号转导级联效应激活。已经证实，PKB 可以利用 IKK 复合体和丝裂酶原活化蛋白激酶（mitogen ac—tivated protein kinase，MAPK）38 刺激 NF－κB 的 RelA/p65，使 NF－κB 活化。PKB 在心肌细胞损伤中的作用非常复杂，它在抗凋亡的同时也促进细胞增殖，导致心肌肥大。最近发现的核定向 Akt 与膜定向 Akt 相比较，能促进心肌细胞生存，但不引起重构，这给心血管疾病的治疗提供了新的治疗途径。

3. EGF 信号通路在恶性肿瘤细胞的浸润、转移的作用

局部浸润和远处转移是恶性肿瘤最重要的特点，也是恶性肿瘤致人死亡的主要原因。表皮长因子（EGF）是一种很强的促有丝分裂因子，能刺激多种组织细胞分裂和增生，并能促进肿瘤细胞浸润和转移。表皮生长因子受体（EGFR）是一种细胞膜蛋白激酶受体，是人表皮生长因

子受体（HER）家族成员之一，也是原癌基因 C—erbB1 的表达产物。HER 家族包括 HER1（EGFR，erbB1）、HER2（NEU，erbB2）、HER3（erbB3）及 HER4（erbB4），其编码的产物共同形成广泛的信号网络，在胚胎发育和肿瘤发生过程中起重要作用，对维持细胞的生长、增殖等起关键作用。EGFR 的过度激活可以促使恶性肿瘤细胞增殖和抑制凋亡，还能促进肿瘤转移和血管形成。EGFR 的表达与肿瘤关系密切，EGFR 信号转导至少与 33% ~50% 的人类表皮肿瘤相关，是表皮肿瘤治疗中不可忽视的重要靶点。此外，在非小细胞肺癌、恶性胶质瘤、乳腺癌、脑膜瘤、头颈部鳞癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、卵巢癌及膀胱癌等上皮性肿瘤等都存在 EGFR 的表达或高表达。人的 EGFFR 受体位于第 7 号染色体，编码约 110kD，经糖基化转运到质膜时为 170kD 左右。EGFR 具有介导多条信号转导通路的作用，通过将胞外信号传递至胞内，调节核内基因的表达，进一步调节细胞的生长和分化。一旦 EGF 和 EGFR 结合，即引起细胞分裂和增生等一系列生化过程，如起调节作用的癌基因激活或抑癌基因失活，从而促进肿瘤细胞的生长及浸润能力，增强转移趋势。随着对肿瘤生物学特性和行为的进一步深入了解，以 EGF/EGFR 为靶点的靶向药物治疗研究将为抗肿瘤治疗开辟崭新领域。

4. p53 在卵泡的发育及胚胎植入中的作用

p53 基因家族由 p53、p63、p73 共同构成，它们均有非常相似的结构域，其中 N 端为转录活化区（transactivation domain，TAD），通过与顺式作用元件的结合发挥转录激活功能；C 端为寡聚体化区（oligomerization domain，OD），形成同源四聚体的活性形式；中间的 DNA 序列结合区（DNA - binding domain，DBD）为中心活性区，可结合特定的 DNA 序列。在肿瘤的发生过程中，p53 基因是经典的抑癌基因，其基因表达突变或缺陷以及功能状态改变往往是促进肿瘤发生、发展的重要因素。近年来，对小鼠和人类的研究显示，p53 基因家族在调节此行哺乳动物生殖功能方面具有重要的作用，包括维持卵泡池的大小、生殖细胞基因组的完整性、排卵、内分泌、胚胎植入及人类的生育等。p53 家族的同源体存在于许多的低等生物，如海葵、果蝇。这些生物均具有短的

生命周期和在成年期不患癌肿的特性，提示抑癌作用不是p53最原始的功能。在海葵中，p53样蛋白nvp63高度表达于生殖细胞；在紫外线诱导时，能促进nvp63蛋白表达和突变的生殖细胞凋亡。在果蝇中，p53发生突变时，特别是受到γ线照射时，生殖细胞基因组极不稳定。因此，p53蛋白在维持生殖细胞基因组的完整性方面具有重要的作用，以防止有害的遗传突变传给下一代，从而增加种族繁殖的成本。$p53^{-/-}$雄性小鼠生育能力正常，而p53雌性小鼠的生殖能力明显下降，表现为妊娠率及产鼠数均明显下降，导致$p53^{-/-}$雌性小鼠妊娠率下降的原因是：在妊娠第4天，$p53^{-/-}$雌性小鼠宫腔内的白血病抑制因子（eukaemia inhibitory factor，LIF）表达量明显低于$p53^{+/+}$雌性小鼠。LIF是哺乳动物妊娠时子宫所分泌的一种细胞因子，其可通过LIF受体复合物（LIF-R和糖蛋白gp-130）增加子宫内膜的接受性，从而促进胚胎植入。对$p53^{-/-}$雌性小鼠注射外源性LIF，可使胚胎植入率明显恢复正常。此外，在人类，胚胎植入和妊娠的维持，还必须依赖于灵长类特异性二聚体糖蛋白激素——HCG。p53具有诱导HCGbeta7（CGB7）基因的表达作用；p53主要是通过结合CGB7基因的启动子来调节CGB7基因的表达，这一结果从内分泌学角度揭示p53对胚胎植入的影响，具有重要的临床指导意义。进一步深入研究p53基因家族在调节生殖功能中的作用机制，可能在基因水平上阐述不同年龄阶段的女性不孕不育的发病机制，从而为不孕不育，尤其是IVF术后反复妊娠失败的患者的临床治疗提供一种新思路。

对于普通人来讲，体内存在的信号分子看不见、摸不着，是一个“隐形战士”，但是随着科技手段的不断发展，研究者们可以通过各类生物化学及分子生物学实验方法放大、观察体内各类信号分子的作用及其相互联系。目前确定的信号分子及其通路已经成千上万，异常复杂。在研究早期阶段（20世纪五六十年代），学者们通过基因敲除手段抑制小鼠体内单一信号分子的表达即可观察到明显的动物表型，例如第10号染色体同源丢失性磷酸酶—张力蛋白基因（PTEN）具有磷酸酶活性及抑癌活性，PTEN的突变缺失是包括泌尿系肿瘤等各种肿瘤发生发展的基础。多个实验小组报道单独敲除PTEN基因即可引发小鼠前列腺癌

的发生与发展过程。但是随着研究过程的深入，目前来讲单一信号分子的改变往往不足以引发显著的细胞功能变化，因此多基因敲除小鼠的使用也成为目前体内研究信号分子及其作用机制的重要手段。这一事实也提示我们体内发挥正常的生理功能信号分子尽管分布位置不同、理化性质迥异，但在功能上是一个有机联系的统一体。相信随着生命科学研究的不断发展，对信号分子的深入理解将帮助我们正确认识生命发展的本质并有助于了解，如炎症、感染、心脑血管疾病、糖尿病、恶性肿瘤等多种疾病的发病机制。

（李　伟　王　卉）

参考文献

[1] Oury F, Sumara G, Sumara O, et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. Cell, 2011, 144 (5): 796 - 809

[2] Walker WH, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Reproduction., 2005, 130 (1): 15 - 28

[3] Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. Cell Signal, 2011, 23 (10): 1515 - 1527

[4] Kramer - Marek G, Longmire MR, Choyke PL, et al. Recent advances in optical cancer imaging of EGF receptors. Curr Med Chem, 2012, 19 (28): 4759 - 4766

[5] Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer. Nat Cell Biol, 2013, 15 (1): 2 - 8

[6] Hu W, Zheng T, Wang J. Regulation of Fertility by the p53 Family Members. Genes Cancer, 2011, 2 (4): 420 - 430

[7] Shi Y, Paluch BE, Wang X, et al. PTEN at a glance. J Cell Sci, 2012, 125 (Pt 20): 4687 - 4692

专题 8

指挥中心的诞生

——神经系统的发育

神经发育是神经科学中一个非常重要的组成部分，它是一门探索单个细胞是如何发育成一个能够执行各种高级功能的极其复杂的神经网络，以及这一过程中存在的奥秘、特征和调控机制，从而揭示大脑这一自然界中最神奇的产物是如何形成的学科。神经系统是机体最重要和最复杂的系统，这不仅因其主宰着机体的一切功能，是人体的指挥中心，还用其谜一样的发生过程吸引着科学家去探索。

神经系统由中枢神经系统（脑和脊髓）和周围神经系统组成。脊椎动物和人的神经系统起源于神经外胚层（neuroectoderm），由神经管（neural tube）和神经嵴（neural crest）分化而成。神经管的前端膨大，衍化为脑，后端变细，衍化为脊髓；神经嵴衍化为周围神经系统。

神经组织的形成

1. 神经管和神经嵴的发生

人胚第 3 周，胚盘的外胚层在其腹侧下面的脊索细胞诱导下，形成神经外胚层。该神经外胚层增厚变成为神经板，随后，神经板两侧向上

隆起形成神经褶，因而神经板变成神经沟。在相当于枕部体节的平面上，神经沟首先愈合成神经管，并向神经沟头、尾两端伸展。后来，头、尾两端未愈合部分分别称前神经孔和后神经孔。在第4周时，前神经孔首先闭合，接着后神经孔闭合，因而形成了完整的神经管。在神经沟愈合形成神经管的过程中，神经褶边缘与外胚层相连续处，神经外胚层细胞迁移出来，分布在神经管的两侧，称神经嵴。神经嵴细胞不断增殖、迁移和分化，一部分细胞聚集形成神经节，另一些向其他类型细胞分化。

2. 神经元和神经胶质细胞的分化

神经管演变为中枢神经系统的神经组织。神经嵴演变为周围神经系统的神经组织。

起初，神经板由单层柱状上皮构成。当神经管形成后，管壁变为假复层柱状上皮，称神经上皮（neuroepithelium）或称神经上皮细胞（neuroepithelial cells），其中具有神经干细胞（neural stem cell）性质的神经上皮细胞增殖，部分细胞迁移至神经上皮的外周，构成新的细胞层，称套层（mantle layer）。在套层，这些具有神经干细胞性质的神经上皮细胞增殖演变为两类细胞，即成神经细胞（neuroblast）和成神经胶质细胞（glioblast）。起初成神经细胞为圆形，随即长出突起，突起逐渐增长并延伸到套层的外周，形成一层细胞稀少的新结构，称边缘层（marginal layer）。神经干细胞是一种具有自我增殖和多向分化潜能的细胞，它可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

成神经细胞一般不再分裂增殖，只有当它们迁移到达目的地，才开始分化为神经元。成神经胶质细胞不仅伴随着成神经细胞的迁移，而且还协助成神经细胞迁移。在成神经细胞迁移过程中，是受其目标位置的细胞产生的趋化生长因子（chemoattractant growth factors）等作用，逐渐分化为各种神经元的。

神经元的分化（neuronal differentiation）可分为神经发生（neurogenesis）、神经迁移、轴突形成和突触发生（synaptogenesis）等过程。神经发生一般是指神经元的诞生。由具有神经干细胞性质的神经上皮细胞增殖演变为成神经细胞，随之成神经细胞分裂增殖丧失，并迁移到目标位置，分化为具有特定功能的神经元。轴突形成是指神经元轴突长出及其沿着特定的目标位置方向伸长。轴突形成在神经环路的构建中起关

键作用。通常，轴突形成开始于未成熟的神经元胞体到达最终目标位置之前。神经元胞体一般先长出轴突，然后才长出树突。当生长的轴突终末延伸到靶细胞并建立突触联系后，才观察到树突从神经元的胞体长出来。这些靶细胞包括其他神经元、肌细胞和腺细胞。在发育早期，有大量的神经元形成，但到后期，有许多未能与靶细胞建立突触联系的神经元，都在一定时间内发生凋亡而消失。

成神经胶质细胞先分化为两种神经胶质细胞的前体细胞，即成星形胶质细胞（astroblast）和成少突胶质细胞（oligodendroblast）。然后，成星形胶质细胞分化为原浆性胶质细胞和纤维性胶质细胞，成少突胶质细胞分化为少突胶质细胞。原来的神经上皮停止分化，变成一层立方形或矮柱状细胞层，称室管膜层（ependymal layer）。关于第三种神经胶质细胞——小胶质细胞的起源问题，至今尚有争议。它的发生时间较晚，有人认为它来源于神经管周围的中胚层间充质细胞。在胚胎发生过程中，一些间充质细胞迁移到中枢神经系统（脑和脊髓）内分化成小胶质细胞；也有人认为它是由血液中的单核细胞分化而成。神经胶质细胞始终保持增殖能力（图 12）。

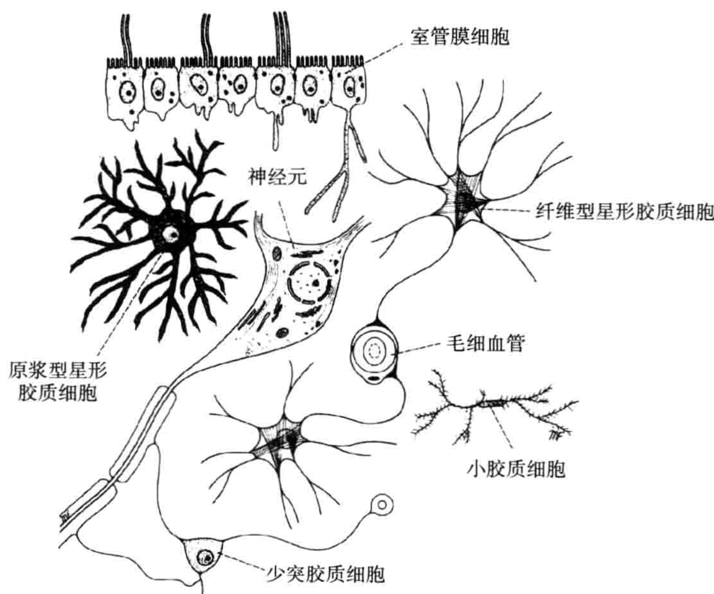


图 12　神经管上皮的分化

中枢神经系统的发生

神经管随着胚体的弯曲生长，头段出现向腹侧的两个弯曲，即头曲和颈曲。以颈曲为界的头段扩大演变为脑的原基——脑泡，颈曲后的尾段保持管状演变为脊髓。

1. 脊髓的发生

神经管颈曲后的尾段演变为脊髓，其管腔变成脊髓中央管。套层分化为脊髓的灰质，边缘层分化为脊髓的白质。套层中成神经细胞和成神经胶质细胞增多而迅速增厚，腹侧部增厚形成左、右基板（basal plate），背侧部增厚形成左、右翼板（alar plate），顶壁和底壁相对薄而窄，分别形成底板（floor plate）和顶板（roof plate）。

随着成神经细胞和成神经胶质细胞的增多，左、右两基板向腹侧突出，致使在两者之间底板形成一条纵形的深裂沟，位居脊髓腹侧正中，称前正中裂。同样，左、右两翼板也增大，使顶板形成一隔膜，称后正中隔。基板形成脊髓灰质的前角（或前柱），其中的成神经细胞主要分化为躯体运动神经元，其轴突穿过边缘层到达骨骼肌，与肌细胞形成突触连接。翼板形成脊髓灰质的后角（或后柱），其中的成神经细胞分化为中间神经元。它接受周围神经的传入信息，通过它的轴突在脊髓内与其他中间神经元形成突触连接。若干成神经细胞聚集在基板和翼板之间，形成脊髓灰质的侧角（或侧柱），其内的成神经细胞分化为内脏传出神经元。边缘层因灰质内神经元的轴突长入和神经胶质细胞的形成而增厚，还有神经嵴发育演变为脑神经节和脊神经节，其中的假单极神经元轴突（中枢突）伸入脊髓内，致使边缘层的轴突数量不断增加，因而发育成白质。至此，神经管的尾段分化为脊髓，其周围的间充质则分化为脊膜。

胚胎第3个月之前，脊髓与脊柱等长，脊髓的下端可达脊柱的尾骨。脊神经发出处与相对应的椎间孔处于同一平面。第3个月后，由于脊柱的增长比脊髓快，脊柱超越脊髓向尾端延伸，脊髓的位置相对上

移。至出生前，脊髓下端与第3腰椎平齐，仅以终丝与尾骨相连。由于节段分布的脊神经均在胚胎早期形成，并从相应的椎间孔穿出，当脊髓的位置相对上移后，脊髓颈段以下的脊神经根变得越来越向尾侧斜行，再穿过其相应的椎间孔离开椎管。腰段、骶段和尾段脊神经在椎管内垂直下行，与终丝共同形成马尾。

2. 脑的发生

（1）脑泡的形成　胚胎第4周末，神经管头段扩大，起初形成3个膨大即脑泡（brain vesicle），由前向后依次为前脑泡（proencephalon）、中脑泡（mesencephalon）和菱脑泡（rhombenencephalon）。第5周时，前脑泡向两侧膨大，形成左、右两个端脑（telencephalon），以后演变为大脑两半球；端脑的尾部形成间脑（dience-phalon）。中脑泡相对变化不大，演变为中脑。菱脑泡的头端演变为后脑（metencephalon），后脑以后演变为脑桥和小脑；尾端演变为末脑（myelencephalon），末脑成为延髓。因此，神经管头段演变为界限分明的5个脑泡，神经管内的管腔也变成脑室。前脑泡左、右的端脑腔演变为左、右侧脑室，间脑中的管腔成为第三脑室；中脑泡的腔形成狭窄的中脑导水管；菱脑泡的腔演变为宽大呈菱形的第四脑室。同时脑泡出现了几个不同方向的弯曲，首先出现的是突向背侧的头曲和颈曲，头曲位于中脑部，又称中脑曲；颈曲成为脑与脊髓之间分界线。之后，又出现两处突向腹侧的弯曲，即在端脑为端脑曲，在末脑为脑桥曲。

在所有的脑室都有脉络丛形成，其发生是由脑室室管膜外的血管增生，以及软膜和室管膜上皮一起突入脑室内。室管膜上皮成为脉络丛上皮，软膜成为血管周围的结缔组织。

（2）脑泡内部组织的演变　脑泡套层的演变与脊髓类似。但是翼板与基板内的成神经细胞增多，向管腔隆起而出现界沟（sulcus limi-tant）。菱脑泡演变成两个部分——后脑和末脑。尾侧的末脑演变成脑干的延髓。后脑则演变成脑干的脑桥和小脑。菱脑泡和中脑泡的翼板与基板产生与第3～12对脑神经相关的神经核和中继核。前脑泡没有基板，间脑演变为丘脑和下丘脑以及上丘脑，并向外突出产生眼的始基（眼杯），还产生松果体和神经垂体的始基。端脑演变为大脑皮质以及嗅束和嗅球。

周围神经系统的发生

神经嵴分化为周围神经系统。此外，头侧的外胚层细胞也参与形成周围神经系统。

1. **神经节的发生**

神经节包括脊神经节、脑神经节、交感神经节和副交感神经节。以下分别简述其发生。

（1）脊神经节的发生　神经嵴细胞向两侧迁移，分列于神经管的背外侧，并聚集成团，分化为脊神经节。这些神经节均属于感觉神经节。神经嵴细胞首先分化为成神经细胞和卫星细胞，成神经细胞再分化为一般躯体和一般内脏感觉神经元。成神经细胞最先长出 2 个突起，成为双极神经元，由于细胞体各面的不均等生长，使两个突起的起始部逐渐靠拢，最后合二为一，于是双极神经元变成假单极神经元。神经节周围的间充质分化为结缔组织被膜。

（2）脑神经节的发生　脑神经节的发生有两种起源，即起源于头侧平面上神经嵴和外胚层基板（ectoderm placode），包括耳板（otic placode）、第 1～4 对鳃弓部分外胚层基板（epibranchial placode）和鼻板。

（3）交感神经节的发生　神经嵴细胞可形成交感神经节的神经元和卫星细胞。起源于脊髓段的神经嵴，部分细胞迁至主动脉的外侧，形成两列节段性排列的神经节，即交感神经节或椎旁神经节，包括颈上、中、下神经节和奇神经节。这些神经节借纵行的交感神经纤维（交感干）彼此相连，形成左、右两条纵行的交感链。节内部分细胞迁移至主动脉的腹侧，形成主动脉前交感神经节（或椎前神经节）。节中的神经嵴细胞分别分化为交感神经元和卫星细胞，节外也有间充质分化为结缔组织被膜。另外，还有部分神经嵴细胞迁入脏壁中胚层，增生并分化为肾上腺髓质的嗜铬细胞及少量交感神经元。

（4）副交感神经节的发生　副交感神经节内是副交感神经的第 2

级神经元，起源于头侧（间脑、中脑和菱脑）和尾侧（能）平面的神经嵴，在发生中该段神经嵴的细胞迁移到头颈部，向尾侧沿着脏壁中胚层进行长距离迁移，侵入发育中的靶器官周围或内部。盆腔部器官的副交感神经节，则起源于骶部的神经嵴。

2．周围神经的发生

周围神经包括脊神经和脑神经。脊神经由感觉神经和运动神经构成；但脑神经则由感觉神经（第 1、第 2、第 8 对脑神经）、运动神经（第 3、第 4、第 6、第 11、第 12 对脑神经）和混合神经（第 5、第 7、第 9、第 10 对脑神经）构成。

神经纤维由神经元长的突起和施万细胞构成。感觉神经纤维是感觉神经元的周围突；躯体运动神经纤维是脑干躯体运动神经核和脊髓前角的运动神经元轴突；内脏运动神经纤维是由脑干内脏运动神经核和脊髓侧角的神经元轴突构成的节前纤维，而节后纤维则是自主神经节内神经元的轴突。施万细胞由神经嵴细胞分化而成，随神经元轴突的伸长而同步增殖和迁移。有髓神经纤维的发生与施万细胞有关。当施万细胞与轴突相接触时，该处凹陷形成纵沟，使轴突陷入沟内，沟两侧的细胞膜贴合形成轴突系膜，之后轴突系膜不断地增宽，并以轴突为轴旋转，形成有多层施万细胞膜的髓鞘，成为有髓神经纤维。无髓神经纤维是一个与多条轴突相贴近，相贴处形成纵沟，但不形成髓鞘的施万细胞。

神经系统发育中的基因调控

在神经系统发育过程中，基因表达的调控是神经板细胞分化的关键。在发育的早期，无论从形态上还是化学上都是比较均匀一致的细胞逐渐演变为异质的细胞，这种现象称细胞分化（cell differentiation）。出现分化的细胞是因为该细胞特定基因有选择地表达的结果。是什么机制调节和控制该细胞特定基因有选择性表达？在细胞分化过程中，基因表达的调控是一个非常复杂的问题，可呈现在基因表达的各个不同阶段

上，也可呈现在基因表达的不同水平上，如有转录水平的调控、转录前后水平的调控、翻译水平的调控和翻译后蛋白质活性调节水平的调控等。一般认为，转录水平的调控是关键阶段。因为这是细胞功能调节的初级阶段，是基因调控的第一步，有较多编码蛋白的基因在这个水平上的调控多于其他水平上的调控。

神经板的细胞分化是受到多种诱导信号的调控，其中一种是脊索细胞提供的诱导信号调控，使神经板逐渐演变为神经沟，再一步演变为神经管，这种由脊索细胞提供的诱导信号调控称神经管背腹化模式（dorsal－ventral patterning）调控。脊索作为组织者在早期起到诱导神经管腹侧中线底板细胞分化的作用。然后，底板细胞在神经管内发挥腹向诱导中心作用。

神经管腹侧细胞的分化信号主要是 HNF3 β和 Shh 两种蛋白分子，它们是脊索细胞 HNF3 β和 *Shh* 基因的表达产物。神经管背侧细胞的分化信号主要是 BMP 蛋白分子，来自于神经板周围的外胚层细胞。

1. HNF3 β基因

HNF3 β基因的表达产物 HNF3 β是一种调节转录因子，它通过激活神经管腹向信号分子的转录来发挥作用。这些信号分子可使神经板细胞和神经管神经上皮发生分化。在脊索和神经管底板中，HNF3 β激活的主要信号分子是 Shh。

2. Shh 基因

Shh 基因的表达产物是 Shh，它是一种信号分子，被 HNF3 β激活表达后，能促使神经板的细胞分化为底板细胞、运动神经元或神经管腹侧中间神经元。在神经管底板中，Shh 也可以通过激活 HNF3 β的表达进一步促进 Shh 的产生，形成信号分子的正反馈环路，在局部不断产生腹向化信号，从而使底板细胞在神经管内发挥腹向诱导中心作用。

3. BMP 基因

BMP 基因表达的信号分子是 BMP，它能增强调节转录因子 Pax－3 和 Msx－1 以及背向化基因 Dorsalin－1 在神经管顶板内的表达，起到诱导神经管背侧细胞分化为神经嵴细胞和背侧中间神经元的作用。

神经系统主要的先天性畸形

1. **神经管缺陷**

因失去脊索的诱导或受到致畸因子的影响，可导致胚胎第4周末神经管未愈合。若是前神经孔未闻，会形成无脑畸形（anencephaly）；若是后神经孔未闭，则会形成脊髓裂（myeloschisis）。无脑畸形常伴有颅顶骨发育不全称脑露（exencenhalv），脊髓裂常伴有脊柱裂（spina bifida）。脊柱裂可发生于脊柱各段，最常见于腰骶部，其严重程度可不同，轻度的患者只表现局部皮肤有一小撮毛发而无其他症状，称隐性脊柱裂；中度的患者较多见，在患处常形成一个大小不等的皮肤囊袋，若其中有脊膜和脑脊液，称脊膜膨出（meningocele）；若既有脊膜和脑脊液，又有脊髓和脊神经根，称脊髓脊膜膨出（meningomyelocele）。由于颅骨的发育不全，也可出现脑膜脑膨出（meningoencephalocele），多发生于枕部；若脑室也随之膨出，称积水性脑膜脑膨出（meningohydroencephalocele）。

2. **脑积水**

脑积水（hydrocephalus）较多见，因脑室系统发育障碍、脑脊液生成和吸收平衡失调、中央水管和室间孔狭窄或闭锁，致使脑脊液增多。由于脑脊液不能正常流通循环，导致脑室积存大量液体，称脑内脑积水（internal hydrocephalus）。由于在蛛网膜下腔积存大量液体，称脑外脑积水（external hydrocephalus）。

神经系统发育的各个过程既具有阶段性又相互交织。干细胞对很多组织的正常发育和维持都起着至关重要的作用，干细胞的生物学特征是自我更新和多向分化。神经上皮并不是一层相同的、不受调控的细胞，而是受位置信息影响的具有特定角色和局限性的发育可塑性的干细胞。神经系统的发育是多基因调控的过程，基因产物与信号通路活化交替作用逐渐使不同的细胞出现基因表达差异，进而出现结构和功能的差异，

最后细胞建立相对稳定的、可传递的、与结构和功能相适应的基因表达模式。

（赵　洁　张远强）

参考文献

[1] 蔡文琴. 发育神经生物学. 北京：科学出版社，2007

[2] 葛学铭，范明. 神经生物学. 北京：人民卫生出版社，2004

[3] 刘斌，高英茂. 人体胚胎学. 北京：人民卫生出版社，1996

[4] Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al. Highly efficient neural conversion of humans and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat Biotechnol, 2009, 27: 275 - 280

[5] Cooper JA. A mechanism for inside - out lamination in the neocortex. Trends Neurosci, 2008, 31: 113 - 119

[6] Lambert JJ, Weill - Engerer S, Liere P, et al. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. Progress in Neurobiology, 2003, 71 (1): 3 - 29

[7] Lavaute TM, Yoo YD, Pankratz MT, et al. Regulation of neural specification from human embryonic stem cells by BMP and FGF. Stem Cells, 2009, 27 (8): 1741 - 1749

[8] Ma DK, Bonaguidi MA, Ming GL, et al. Adult neural cells in the mammalian central nervous system. Cell Res, 2009, 19 (6): 672 - 682

[9] Mahendrd S Ra. Stem cells and CNS development. Totow Newjersey: Human Press, 2001

[10] Yu J, Vodyanik MA, Smuga - Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from somatic cells. Science, 2007, 318: 1917 - 1920

专题 9

人体王国军队之组建

——免疫系统的发育

免疫系统是人体王国的军队，时刻监视着外来的入侵者，清除机体内的腐败变质分子，保护机体的正常运转和内环境的稳定。

免疫系统（immune system）由免疫活性细胞、淋巴组织和淋巴器官3个层面的架构组成。淋巴器官分为中枢性淋巴器官（哺乳类动物和人为胸腺与骨髓，鸟类为胸腺和腔上囊）和周围淋巴器官（淋巴结、脾、扁桃体等）。淋巴组织包括分布于器官内的弥散淋巴组织和淋巴小结等。免疫活性细胞除构成淋巴器官和淋巴组织的主要细胞成分外，还包括分散于血液和其他组织内的淋巴细胞、浆细胞、抗原提呈细胞等，广义的免疫活性细胞还包括粒细胞、肥大细胞和血小板等。以上成分分散于全身各处，但可通过血液循环和淋巴循环相互联系形成一个整体。

免疫细胞的发育

人体免疫细胞的发育过程历经以下时间点：胚胎第3周卵黄囊发生造血干细胞，第6周造血干细胞由卵黄囊血岛迁入肝内，第7周血液内

出现淋巴祖细胞，第 8 周淋巴细胞进入胸腺，第 9 周肝内 B 细胞开始分化，第 10 周脾内 B 细胞表面出现 IgM，第 11 周胸腺细胞能形成羊红细胞花结，第 12 周淋巴结出现淋巴细胞，第 15 周 50% 的胸腺细胞能形成羊红细胞花结，第 29 周胎儿若受到异体抗原刺激能出现免疫应答，形成浆细胞。

T 细胞和 B 细胞均是由造血干细胞在不同的微环境调控下发育分化形成的。骨髓是成年哺乳动物 B 细胞发育的主要场所，胸腺则是 T 细胞发育的主要器官。免疫系统的分化发育还受遗传以及神经内分泌的调控。

1. **T 细胞的发育与分化**

造血干细胞不对称性分裂所产生的两个子细胞，其中之一分化为髓系造血祖细胞或淋巴系造血祖细胞，胚胎发育的第 7 周，骨髓内的淋巴样前体细胞定向发育成原 T 细胞，在进入胸腺之前或进入胸腺被膜下称前 T 细胞。前 T 细胞向胸腺实质内迁移后即称胸腺细胞（thymocyte）。胸腺细胞从皮质浅层到深层，进而经过皮质与髓质交界处进入髓质，在胸腺微环境的作用下逐渐分化成熟，根据对人胸腺不同部位胸腺细胞表型分析得出，胸腺细胞的分化可分 4 个阶段：

（1）前 T 细胞　主要位于胸腺被膜下。细胞体积较大，细胞质内细胞器较少，表面尚未出现 T 细胞标志，但表达末端脱氧核苷转移酶（TdT），部分细胞表达 CD7。

（2）早期胸腺细胞　主要分布在被膜下、小叶间隔及胸腺皮质浅层。细胞体积大，核圆形，染色浅，核仁不明显，细胞质中有少量游离核糖体和线粒体。细胞表达 CD2、CD5 和 CD3，但缺乏 CD4 和 CD8，因此又称双阴性 T 细胞。

（3）普通型胸腺细胞　由早期胸腺细胞经数次分裂后移向皮质深层发育而来。细胞体积中等大，核染色较深，核仁较明显。细胞表达 CD3、CD1 和 T 细胞抗原受体（TCR），随即出现 CD4 和 CD8。CD1 是此期细胞的特征性标志，在后期逐渐消失。$CD4^+$ 和 $CD8^+$ 双阳性胸腺细胞占此类细胞总数的 80%～85%。现认为，只有少部分普通胸腺细胞能继续分化为成熟胸腺细胞，离开胸腺。

(4) 成熟胸腺细胞　主要位于皮质深层或胸腺髓质。细胞体积较小，难与普通胸腺细胞区别。细胞表达 $CD4^+$ 或 $CD8^+$，为单阳性细胞群体，并同时高表达 TCR。

成熟胸腺细胞大部分通过皮质与髓质交界处的毛细血管后微静脉进入血液，成熟胸腺细胞迁出胸腺后，即成为处女型 T 细胞，它们依靠细胞表面的归巢受体迁移到外周淋巴器官的胸腺依赖区定居。

2. B 细胞的发育与分化

人胚第 7～18 周，造血干细胞在肝内发育，成熟为 B 细胞。在这期间，肝内的造血干细胞不断移迁入骨髓，在骨髓内分化为各类造血细胞。18 周后，B 细胞主要在骨髓内发育分化。B 细胞的发育过程可分为两个阶段：

(1) 抗原非依赖阶段　为中枢淋巴器官（骨髓）分化发育阶段。此阶段由淋巴祖细胞先发育成原 B 细胞和前 B 细胞，前 B 细胞与骨髓造血基质细胞相互作用，在多种 B 细胞分化因子（IL－3、SCF、IL－7、GM－CSF、TGF－β等）的调节下，经幼 B 细胞逐步分化为对抗原具有应答能力的成熟 B 细胞。

(2) 抗原依赖阶段　成熟 B 细胞离开中枢淋巴器官，迁移至周围淋巴器官，再次与抗原接触后活化并大量增殖，大多数细胞分化为能合成和分泌抗体的浆细胞，少部分停止分化而成记忆 B 细胞。

3. NK 细胞的发育与分化

NK 细胞由骨髓造血干细胞分化而来，大体经历了原始细胞、前体细胞和成熟细胞三个阶段。原始细胞和前体细胞主要位于胎儿骨髓，NK 细胞活性很弱；新生儿外周血 NK 细胞呈 $CD56^+$、$CD3^+$，活性较强；成人外周血的 NK 细胞呈 $CD56^+$、$CD3^-$、$CD11b^+$，活性最强。

4. 抗原提呈细胞的发育与分化

(1) 树突状细胞　髓系树突状细胞（dendritic cell，DC）和淋巴树突状细胞均起源于造血干细胞，但受不同因素的影响，有不同的分化途径。髓系 DC 前体细胞先通过血流进入非淋巴组织，并居住在那里直到与外来抗原相遇。未成熟 DC 接触、摄取和处理抗原后迅速成熟，并通过血液或淋巴选择地迁移到周围淋巴器官的 T 细胞区，把抗原提呈给 T

细胞，并通过免疫协同刺激分子间的作用，激发 T 细胞的免疫应答。

(2) 巨噬细胞　骨髓造血干细胞增殖分化形成 CFU - GM，在 GM - CSF、IL - 3、IL - 6 等造血调控因子作用下增殖分化成巨噬细胞祖细胞 (colony forming unit - macrophage, CFU - M)，随后在 GM - CSF、M - CSF、IL - 5、TNF 等调节下形成原始单核细胞、幼单核细胞，并进一步发育为单核细胞，后者穿越血管壁进入组织器官分化为巨噬细胞。

免疫器官的形成

1. 胸腺的发生

胸腺起源于第 3、第 4 对咽囊的内胚层，第 2、第 3、第 4 对鳃沟的外胚层也参与其形成过程，内胚层细胞分化形成胸腺髓质的球形上皮细胞，而外胚层细胞则分化为皮质和髓质的星状上皮细胞。胚胎发育第 5 周，第 3 对咽囊内胚层向尾侧伸出管状突，相应的第 3 对鳃沟底部外胚层也伴随移动。第 6 周时，管状末端形成明显的囊团与咽囊壁脱离。第 8 周，两侧囊团增生膨大向胚体尾端继续伸长，沿胸骨后降入纵隔，并在甲状腺和甲状旁腺的尾侧向中线靠拢，愈合。此时鳃沟来源的外胚层包围在外周，形成胸腺原基。第 9 周，淋巴祖细胞迁入胸腺原基，分布在上皮细胞之间的间隙内，并迅速增殖分化为胸腺细胞。第 11 ~ 12 周，血管和神经已达到分化中的髓质，巨噬细胞的前体也进入胸腺，这时胸腺的小叶结构和皮质与髓质分界已渐明显，皮质分内、外两区，外皮质色浅，为淋巴细胞增殖区。此外，髓质内出现散在的胸腺小体。至第 20 周，胎儿胸腺结构大致已发育成熟。此后逐渐长大，一直延续到青春期，而后胸腺开始缓慢退化，皮质和髓质均逐渐减少，脂肪组织相对增多。60 岁以后，胸腺内的淋巴细胞成分已很少，皮质细胞有时变为索条状或管状，有的胸腺小体变成上皮性囊，并开始纤维化。

2. 淋巴结的发生

胚胎第 7 ~ 8 周时，全身淋巴毛细管网基本形成，与此同时，局部间充质腔隙也互相融合扩大，形成许多淋巴囊，如颈淋巴囊、髂淋巴囊

和乳糜池等，各淋巴囊均与其引流区域的淋巴管相连接。围绕淋巴囊和大淋巴管周围的细胞渐聚集成团，起初为不明显的细胞群，以后淋巴细胞随小血管一起迁入，并在此增殖形成淋巴结群。第 10 周时，除乳糜池上部以外，其他淋巴囊已发育成为早期淋巴结群。淋巴结的发育过程如下：首先，淋巴囊生成后，囊壁的结缔组织逐渐伸入并穿越淋巴囊，形成互相交织的网状淋巴丛，它构成淋巴结的基本支架。一个淋巴丛也可形成数个淋巴结。进入淋巴丛的淋巴管形成输入淋巴管，离开淋巴丛的淋巴管形成输出淋巴管，淋巴丛的管道也可参与形成输出淋巴管及被膜下淋巴窦。最初聚集于淋巴结原基处的淋巴细胞是由造血干细胞在肝、胸腺和骨髓内分化而来的淋巴祖细胞迁移而来。聚集于淋巴结原基的淋巴细胞簇在第 10 周后才逐渐变大，沿着富有小血管的结缔组织索形成致密的淋巴细胞索，成为早期髓质结构特征。胎儿第 4 ~ 6 个月已出现不典型的淋巴结，第 7 ~ 8 个月其结构进一步完善，足月时基本发育成熟。一般认为胎儿后期淋巴结逐渐长大，但淋巴结的组织发生一直未完成，因此没有免疫应答功能。

3. **脾的发生**

人脾的发生起始于胚胎第 5 周，此时胃背系膜内的间充质细胞密集成群，并突入腹腔，故脾的表面有间皮。胃背系膜发育形成网膜囊，向左突出，脾亦被牵向胃的左背侧，并参与构成小网膜的边缘。人胚第 6 周时，脾仅为一群密集的间充质细胞团，血管进入其中并分支形成血窦。第 8 周可分辨出原始脾索和脾窦。第 9 周造血干细胞通过肝血循环入脾，在血窦周围的网状组织内增殖分化为各种系列的造血祖细胞和前体细胞，如原红细胞、原淋巴细胞和原巨核细胞等。第 9 ~ 12 周，脾内小动脉周围出现少量 T 细胞和 B 细胞，细胞呈小集落状。随着胎龄增长，B 细胞集落逐渐增大，形成脾小体。第 4 ~ 5 个月，脾造血功能活跃，不仅可生成髓系血细胞，而且可生成淋巴系细胞。此时，血窦内皮细胞也逐渐演变成杆状，血窦内外均可见大小不同的造血灶，亦可见巨噬细胞吞噬血细胞的现象。此后，密集的淋巴细胞团演变成白髓，脾索内的淋巴细胞也增多。胚胎第 5 个月后，脾生成髓系血细胞的功能逐渐被骨髓取代，但生成淋巴细胞的功能则终身保持。第 6 个月时脾的红

髓、白髓已能很清楚地进行区分，淋巴组织逐渐增多，脾随之演变成淋巴器官，许多T细胞进入小动脉周围的结缔组织内，形成动脉周围淋巴鞘。第8个月胎儿脾小体外周出现边缘区。之后脾内结缔组织增多，被膜增厚，小梁结构也非常清楚。

4. 扁桃体的发生

腭扁桃体由第2对咽囊内胚层发育而来，内胚层细胞增殖形成细胞索，并向下生长伸入间充质内。细胞索中央的细胞向周围分散开形成扁桃体隐窝上皮，而间充质细胞围绕隐窝形成网状支架。人胚第3个月，由骨髓和胸腺迁移而来的B细胞和T细胞进入隐窝，并聚集成淋巴小结，深部的间充质形成被膜。咽扁桃体和舌扁桃体发生于第一咽囊的后壁和舌根部，两者的上皮均来源于前肠头端的内胚层，其组织发生与腭扁桃体相似。

免疫力的建立

免疫力是指机体识别和清除抗原性异物的功能。机体免疫系统通过识别自我和非我的抗原物质，产生免疫应答，以承担免疫保护、免疫自稳和免疫监视功能。通过这些基本功能，防御和消除病原体的侵害，清除体内衰老和受损伤的细胞及其他成分，并通过免疫网络调节免疫应答的平衡，维持免疫功能在生理范围内的相对稳定性，监视、识别并销毁体内出现的突变细胞，排斥异体细胞等。

1. 胚胎时期的免疫特点

在胎儿期有相当一段时间，T细胞与抗原相互作用，导致对抗原的长期甚至永远的无反应或耐受性，虽然这种耐受性是阻止炎症发生，却代表着一种非常重要的免疫应答。B细胞可因以上作用而在胎儿期被克隆清除或被抑制。T细胞的生存期长，保证了这段时期控制与自身抗原接触生存期。耐受性的诱导约从第10周T细胞产生开始，至胎儿第16~18周时完成。正常情况下，这段时期遇到的唯一抗原是自身抗原。在妊娠的前9周，由于这种耐受机制也使胎儿蒙受严重损害，此时胎儿

若受到风疹病毒等感染，T细胞不起反应而对这些病原微生物产生长期耐受性，而导致胎儿生长迟缓、死亡或先天畸形。

正常胎儿在出生前不具备对付周围抗原的免疫反应。母体的IgG自第18周起通过胎盘输送至胎儿，以保证新生儿有足够的被动获得的IgG抗体，能防御来自妊娠母体的抗原攻击，但这种抗体对胎儿接触非来自母体的抗原并无防御作用。当来自母体的IgG在新生儿体内逐渐分解时，新生儿自己的免疫系统趋于成熟，并开始产生自己的IgG，婴儿在出生后第3个月已能合成IgG，第4个月IgG的产生已能跟上需要，2~3岁时达成人水平。

2. **固有免疫的建立**

固有免疫亦称非特异性免疫，是生物体在长期种系进化过程中形成的一系列防御机制。固有免疫在个体出生时就已具备，可针对侵入的病原体迅速应答，产生非特异抗感染免疫作用。也可参与对体内损伤衰老或畸变细胞的清除，同时在特异性免疫应答过程中起重要作用。

参与固有免疫应答的基础物质包括：①皮肤、黏膜及附属成分屏障、血-脑屏障和血-胎屏障等组织屏障，它们具有机械性地阻挡病原体侵入体内的作用，而且可以通过分泌多种抗菌物质抑制和杀伤病原体；②固有免疫细胞，如巨噬细胞可以非特异吞噬杀伤病原微生物，NK细胞、NKT细胞等可直接杀伤某些肿瘤细胞和病毒感染的细胞；③由固有免疫细胞分泌不同的细胞因子，产生不同的免疫调节作用或介导炎症反应。

固有免疫可分为瞬时固有免疫，即发生于感染的0~4小时，皮肤、黏膜及其分泌液中的抗菌物质和正常菌群作为物理、化学和微生物屏障，可阻挡外界病原体对机体的入侵，具有即刻免疫防御作用。早期固有免疫，发生于感染后4~96小时，此时，在某些细菌成分如脂多糖和感染部位组织细胞产生的炎症介质与细胞因子（IFN-γ、GM-CSF、M-CSF和MCP-1）作用下，感染周围组织中的巨噬细胞被召集到炎症反应部位，并被活化，以增强局部抗感染免疫应答能力；适应性免疫应答诱导阶段发生于感染96小时后，巨噬细胞和树突状细胞可将摄入的外源性抗原和内源性抗原加工处理为具有免疫原性的小分子肽段，并

以抗原肽－MHCⅡ／Ⅰ类复合物的形式表达于巨噬细胞表面，供 $CD4^+$/$CD8^+$T 细胞识别。当 T 细胞通过表面 TCR－CD8 复合受体分子和 CD4/CD3 辅助受体分子与巨噬细胞表面相应抗原肽－MHCⅡ／Ⅰ类分子复合物结合后，可诱导 T 细胞产生活化第 1 信号。在此基础上，巨噬细胞通过表面 B7 和 ICAM－1 等黏附分子与 T 细胞表面相应黏附分子 CD8 和 LFA－1 等分子结合发生相互作用，可产生其刺激信号，提供 T 细胞活化第 2 信号，使 T 细胞活化，启动特异性免疫应答。此外，病原体等抗原性异物被巨噬细胞吞噬消化后，其降解产物可通过胞吐作用排出胞外，其中有些降解产物能直接激活 B 细胞，启动体液免疫功能。

3. 细胞免疫功能的建立

T 细胞发育成熟后，获得识别自我与非我的能力，其关键步骤是双阴性胸腺细胞向双阳性胸腺细胞的分化阶段所发生的阳性选择和阴性选择。在阳性选择中 $CD4^+CD8^+$ 双阳性胸腺细胞在 TcR αβ的介导下，与胸腺上皮细胞表面 MHCⅠ或 MHCⅡ类分子发生有效结合，MHCⅠ类分子选择双阳性胸腺细胞的 CD8 共受体，使 CD4 共受体减少；MHCⅡ类分子则选择双阳性胸腺细胞的 CD4 共受体，使 CD8 共受体减少。其结果使 $CD4CD8^+$T 细胞具有识别自身 MHCⅠ类分子/外来抗原复合物的能力，而 $CD4^+CD8^-$T 细胞则具有识别自身 MHCⅡ类分子/外来抗原复合物的能力，这是 T 细胞获得 MHC 限制性的基础。在阴性选择中胸腺内的树突状细胞和巨噬细胞表达高水平的 MHCⅠ类和 MHCⅡ类分子，它们与自身抗原结合成复合物，对已经历过阳性选择的胸腺细胞进行阴性选择。能识别 MHC 自身抗原复合物的胸腺细胞即被激发而发生凋亡，不能识别该复合物的胸腺细胞则继续发育。通过选择，凡能与自身抗原相结合或与自身 MHC 分子不相容的细胞被淘汰，仅有少量胸腺细胞成熟为与异体抗原发生反应的 $CD4^+CD8^-$ 或 $CD4^-CD8^+$ 的单阳性 T 细胞，迁移离开胸腺。

初始 T 细胞随血液循环到达外周淋巴器官，并周而复始地在体内循环，以便随时识别特异性抗原。初始 T 细胞通过其细胞膜表面的 T 细胞抗原受体（TCR）与抗原提呈细胞或靶细胞表面的抗原肽－MHC 分子复合物特异性识别，即它识别抗原肽的表位，这是 T 细胞特异性活化的

第一步。TCR 也必须同时识别自身 MHC 分子的多态性部位，这种特性称 MHC 限制性。

初始 T 细胞的完全活化，需要两种活化信号和细胞因子的协同作用，第 1 信号由 TCR 与抗原特异性结合，即 T 细胞对抗原识别，经 CD3 分子将信号传导至细胞内。第 1 信号的基本作用，是使 T 细胞克隆被抗原活化后产生的适应性免疫应答具有严格的特异性。第 2 信号则由抗原提呈细胞或靶细胞表面的协同刺激分子，与 T 细胞表面相应的协同刺激分子受体相互作用而产生。在协同刺激信号的作用下，已活化的抗原特异性 T 细胞增殖，并分化为效应 T 细胞而发挥作用。

特异性细胞免疫的效应细胞主要是 Th1 型 $CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$CTL 细胞，前者经活化巨噬细胞而诱导炎症性迟发型超敏反应，在机体抗胞内病原感染中起重要作用；后者可分泌细胞毒素及诱导细胞凋亡，以杀死带抗原的靶细胞。可见特异性细胞免疫应答在清除胞内病原感染、排斥异体移植物及抗肿瘤免疫反应中起重要作用。

4. 体液免疫功能的建立

B 细胞是免疫系统中的抗体产生细胞，在抗原刺激和 T 细胞辅助下，B 细胞被激活，增殖分化为浆细胞，产生抗体执行体液免疫功能。

B 细胞表面最为重要的分子是 B 细胞抗原受体（BCR）复合体，它由识别和结合抗原的胞膜免疫球蛋白（mIg）和传递抗原刺激信号的 Ig α（CD79 α）/Ig β（CD79 β）异源二聚体组成。B 细胞对胸腺依赖性抗原（TD 抗原）的免疫应答始于抗原与 B 细胞的 BCR 结合，所产生的信号经由 CD79a/CD79b 传导至细胞内。此即为激活 B 细胞的第 1 信号。但仅有第 1 信号是不够的，还需要第 2 信号，即 Th 细胞给予的协同刺激信号，此信号主要由 Th 细胞和 B 细胞表面的协同刺激分子间的相互作用产生，及分泌的细胞因子向 B 细胞提供的第 2 活化信号（辅助刺激信号）。活化的 B 细胞增殖分化为浆细胞产生抗体，活化的 B 细胞还具有提呈抗原和参与免疫调节的功能。

免疫异常与发育

1. 原发性免疫缺陷病

原发性免疫缺陷病是由于遗传性或先天性因素所致的免疫功能缺陷病，其临床特点是反复或持续性感染。迄今已发现100余种原发性免疫缺陷疾病，可分为几种类型：①抗体生成缺陷；②抗体生成缺陷与细胞免疫缺陷并存的联合免疫缺陷；③细胞免疫缺陷；④补体生成缺陷；⑤吞噬功能缺陷（图13）。

（1）X链锁无丙种球蛋白血症　该病为B细胞病，其特点是男性儿童血清中免疫球蛋白完全缺如或极少，其发病机制是btk基因发生突变。患儿在生后6个月内，由于来自母体的抗体被耗竭，被动保护作用逐渐丧失，以后就会出现反复感染。实验室检查发现患儿T细胞数及细胞免疫功能正常，但淋巴结和脾等淋巴器官中淋巴小结发育差且无生发中心，体内无或很少有浆细胞，血液中IgG水平比正常婴儿低很多，尤其是IgM极低。

（2）普通变异型免疫缺陷病　是一种反复发生的细菌感染、低丙种球蛋白血症和缺乏抗体反应的综合性疾病，属于体液免疫缺陷为主的疾病，发病机制是B细胞分化、增殖或转化成浆细胞的功能缺陷。目前认为不少病例存在信号传导的异常。

（3）选择性IgA缺陷病　患者B细胞发育成熟停滞，外周血中表达IgA的浆细胞明显减少，但有表达IgM和IgD的浆细胞。本病多数是因为常染色体的隐性或显性遗传所致。

（4）DiGeorge综合征　属T细胞病，婴儿生下来无胸腺和甲状旁腺，是一种伴有甲状旁腺功能低下的细胞免疫缺陷，并可能伴有其他畸形，如特殊面容、心血管异常等。近年来采用胸腺移植治疗此病已获成功。

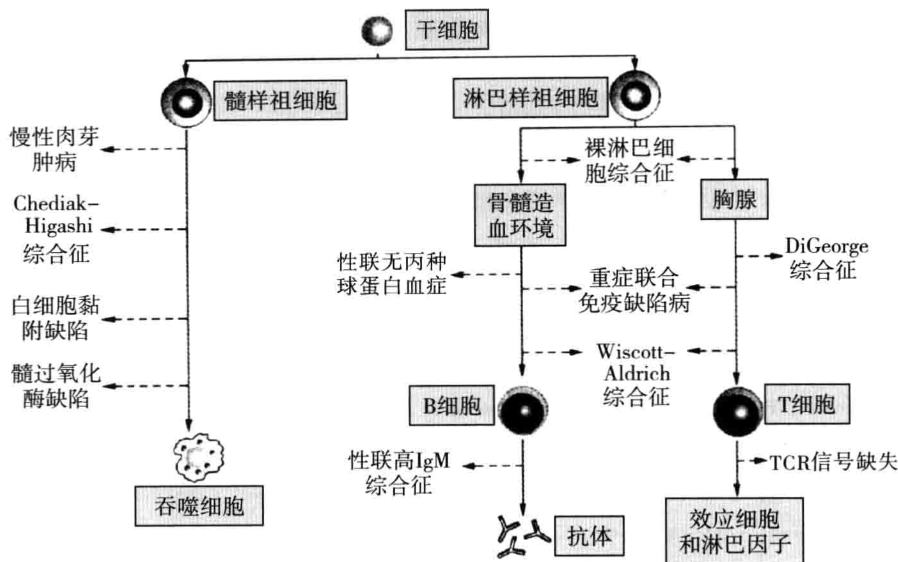


图 13　免疫缺陷病的细胞基础

2. 淋巴器官畸形

(1) 先天性胸腺不发育　先天性无胸腺者多伴以无甲状旁腺，见于 DiGeorge 综合征。

(2) 异位胸腺及附加胸腺组织　异位胸腺可见于颈部，多与下甲状旁腺相连。胸腺常见形态变异，可表现为细长条索状，或延伸至颈部，气管前外侧可见纤维索连于甲状旁腺。

(3) 副脾　是较为常见的先天性脾畸形，发生率在 10% 左右。同时可有一个或多个副脾存在，直径约 1cm，多见于脾门处。副脾可完全或部分地包埋在胰尾或胃脾韧带内。

(4) 先天性无脾综合征　无脾综合征为少见的先天性综合征，发生率约 1/50 000，占先天性心脏病尸检测数的 2.3%。此先天性综合征常伴有复杂而重要的心和大血管畸形（如二腔心、三腔心、共房室口、永存动脉干等）、内脏反位、肝和脾不正常分叶，并有对称性发育倾向（如对称性双侧三叶肺，肝左、右叶大小对称，双上腔静脉等）。畸形患儿多在 2 岁前死亡。

（张金山　张远强）

参考文献

[1] 张远强. 发育生物学. 北京：人民卫生出版社，2007

[2] 高英茂. 组织学与胚胎学. 北京：人民卫生出版社，2005

[3] 龚非力. 医学免疫学. 北京：科学出版社，2003

[4] Amsen D, Blander JM, Lee GR, et al. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen - presenting cells. Cell, 2004, 117 (4): 515 - 526

[5] Bix M, Kim S, Rao A. Immunology. Opposites attract in differentiating T cells. Science, 2005, 308 (5728): 1563 - 1565

[6] Boros B, Patrick M. Transcriptional control of B cell development and function. Gene, 2004, 327 (1): 1 - 23

[7] Cho ML, Kang JW, Moon YM, et al. STAT3 and NF - kappaB signal pathway is required for IL - 23 - mediated IL - 17 production in spontaneous arthritis animal model IL - 1 receptor antagonist - deficient mice. J Immunol, 2006, 176 (9): 5652 - 5661

[8] Guan X, Nishikawa M, Takemoto S, et al. Injection site - dependent induction of immune response by DNA vaccine: comparison of skin and spleen as a target for vaccination. J Gene Med, 2010, 12 (3): 301 - 309

[9] Hachney JA, Charbord P, Brunk BP, et al. A Molecular profile of a hematopoietic stem cell niche. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 13061 - 13066

[10] Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, et al. T helper cell fate specified by klnase - mediated interaction of T - bet with GATA - 3. Science, 2005, 307 (5708): 430 - 433

[11] Abdullah JM, Li X, Ronald G, et al. A Novel Evolutionarily conserved RING finger gene, Is differentially expressed in mouse fetal and adult hematopoietic stem cells and progenitors. Blood Cells Molecules Diseases, 2001, 27 (1): 320 - 335

[12] Joseph E, Labrie Ⅲ, Lisa B, et al. Bone marrow microenvironmental changes in aged mice compromise V (D) J recombinase activity and B cell generation? Seminars in Immunology, 2005, 17 (5): 347 - 355

[13] Baron MH. Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog - mediated signals. Differentiation, 2001, 68: 157 - 185

[14] Martins GA, Hutchins AS, Reiner SL. Transcriptional activators of helper T cell fate are required for establishment but not maintenance of signature cytokine expression. J Immu-

nol, 2005, 175 (9): 5981 - 5985

[15] Mishan - Eisenberg G, Borovsky Z, Weber MC, et al. Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein14. J Immunol, 2004, 173 (9): 5524 - 5530

[16] Mittal A, Papa S, Franzoso G, et al. NF - kappaB - dependent regulation of the timing of activation induced cell death of T - lymphocytes. J Immunol, 2006, 176 (4): 2183 - 2189

[17] Orkin SH. Hematopoietic stem cells: Molecular diversification and developmental interrelationships. Stern Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

[18] Vacca A, Felli MP, Palermo R, et al. Notch3 and pre - TCR interaction unveils distinct NF - kappaB pathways in T - cell development and leukemia. EMBO J, 2006, 25 (5): 1000 - 1008

[19] Wurtz O, Bajenoff M, Guerder S. IL - 4 - mediated inhibition of IFN - gamma production by CD4^{+} T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms, 2004, 16 (3): 501 - 508

[20] Zhu J, Min B, Hu LJ, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T (H) 1 - T (H) 2 responses. Nature Immunol, 2004, 5 (11): 1157 - 1165

专题 10

远程作战之师

——内分泌系统的发育

食物来了，人的消化系统的各器官依次扑上，牙齿、舌、胃、肠等器官直接与食物短兵相接，通过物理的咬、搅或者化学的方法处理食物；空气来了，呼吸系统的鼻、气管、肺等器官也是冲着氧气扑面而上，直接从空气中摄取氧气，排除二氧化碳；泌尿系统的肾直接从血液中分离出尿，输尿管、膀胱、尿道则分担导尿、储尿、排尿的功能……这些系统、器官与自己的靶子总是直接接触，高效地发挥作用。不同的是人体还有一个系统，它的器官在发挥作用的时候即使距离靶子比较远，也能以它独特的方式有效地作用于靶标。它就是人体的内分泌系统，堪称人体内的远程作战之师！

内分泌系统（endocrine system）由内分泌腺和散在的内分泌细胞组成。内分泌腺主要包括甲状腺、甲状旁腺、肾上腺和垂体。

内分泌腺区别于外分泌腺的主要特点是无导管，所以又称无管腺。内分泌腺细胞常排列成团、索、网或滤泡状，并且周围一般有丰富的毛细血管，通过血管而不是导管输送激素。

内分泌腺能够远程作战的秘密在于内分泌细胞能分泌激素（hormones），也就是常说的荷尔蒙。激素按其化学性质可分为含氮激素和类

固醇激素两类。含氮激素包括氨基酸衍生物、胺类、肽类和蛋白质类等。分泌含氮激素的内分泌细胞超微结构与蛋白质分泌细胞相似，即胞质内含有丰富的粗面内质网、高尔基复合体肌膜包分泌颗粒。类固醇激素包括肾上腺素皮质激素和性激素。分泌类固醇的内分泌细胞胞质内含丰富的滑面内质网、呈管状嵴的线粒体和较多的脂滴，无分泌颗粒。

内分泌腺能够远程作战，主要是借助激素通过血液循环作用于远处的特定器官——靶器官或特定细胞——靶细胞。靶细胞上有与相应激素结合的受体，能与相应激素结合产生特定的效应。少部分激素直接作用于邻近细胞，称旁分泌。内分泌系统的作用作为是机体主要调节系统，与神经系统相辅相成。共同调节机体的生长发育和各种代谢、维持内环境稳定、影响行为并控制生殖。

下面我们以主要的内分泌腺为例，和大家一起来了解远程作战之师——内分泌系统的发育。

甲状腺

甲状腺的发育与消化系统的发育相关。在人胚胎发育到第 3 ~ 4 周时，原始消化器官——原肠逐渐由内胚层的卷折形成，头端为前肠，前肠起始部分为原始咽。胚胎发育到第 4 周，原始咽逐渐向外侧膨胀而出，形成 5 对咽囊（图 14）。

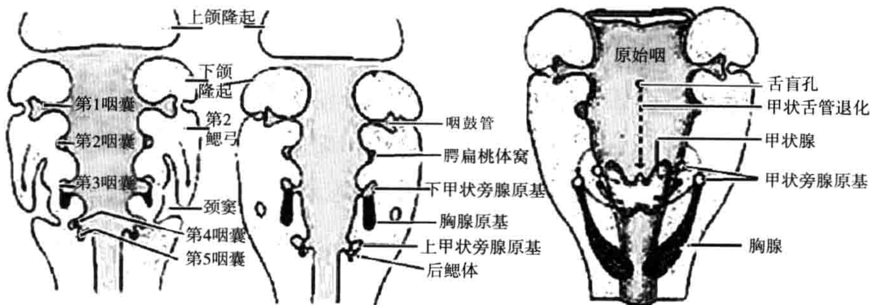


图 14　咽囊的演变

在第1对咽囊之间、咽腔腹侧的内胚层向下方陷入，形成一个憩室状盲管结构，称作甲状舌管，即甲状腺始基，以后其沿着颈部正中向尾侧的间质内伸展生长，末端为一团甲状腺细胞，向两侧膨大，形成甲状腺侧叶，最后在颈正中气管前方形成正常甲状腺。

在人胚胎发育到第6周时，与舌相连的狭长的甲状舌管自行退化闭合，仅在其起始点处留下一浅凹，即舌盲孔，甲状腺因此就断开了与前肠的连接。如果在此过程中，甲状舌管退化不完全，或者说闭合不完全，则残存管状结构部分因上皮分泌物积聚，可在颈前正中舌根至甲状腺的行程内形成甲状舌管囊肿；囊肿可通过未退化的甲状舌管与舌盲孔相通。甲状舌管囊肿可继发感染并形成瘘，则称作甲状舌管瘘。因其发生于颈中线，故又称先天性颈中线囊肿和瘘管。

第5对咽囊的细胞形成一个细胞团，称为后鳃体，会向尾侧迁移，移入甲状腺，成为后来的滤泡旁细胞。

在胚胎发育到第10～12周，含胶质的甲状腺滤泡出现，开始分泌甲状腺激素。在较低等的尾索动物和头索动物中，内柱被视为脊索动物甲状腺的同源器官。内柱是一个位于鳃裂，充满腺体的结构，它可以分泌含碘的黏性物质。

发育到成年，甲状腺重约25克，女性的甲状腺略重于男性，并在月经期与妊娠期略有增大。老年人的甲状腺则逐渐萎缩，重量减轻。

发育成熟的甲状腺表面包有薄层结缔组织被膜，被膜伸入实质将甲状腺实质分隔成大小不等的小叶，每个小叶内含有20～40个滤泡，滤泡间为少量的疏松结缔组织、丰富的毛细血管和成群分布的滤泡旁细胞。

1. 甲状腺滤泡

甲状腺滤泡是构成腺实质的主要成分，大小不等，直径0.02～0.9mm，呈圆形或不规则形。滤泡由单层立方的滤泡上皮细胞围成，滤泡腔内充满透明的胶质。滤泡上皮细胞形态可因其功能状态不同而改变，功能活跃时，细胞增高呈砥柱状，腔内胶质减少；反之，细胞变矮呈扁平状，腔内胶质增多。胶质为滤泡上皮细胞的分泌物，是一种糖蛋白，称甲状腺球蛋白，在切片上呈均质状，嗜酸性。胶质边缘常呈空泡

状，是滤泡上皮细胞吞饮所致。

电镜下，滤泡上皮细胞游离面有微绒毛，胞质内含发达的粗面内质网、较多的线粒体和散在的溶酶体，高尔基复合体位于核上区。顶部胞质内有体积较小、中等电子密度的分泌颗粒和从滤泡腔内摄入的低电子密度的胶质小泡。滤泡上皮细胞基底面基膜完整，邻近结缔组织内含有孔毛细血管和毛细淋巴管。

滤泡上皮细胞合成和分泌大家熟知甲状腺素，其过程包括合成、贮存、碘化、重吸收、分解和释放。滤泡上皮细胞从血中摄取氨基酸，在粗面内质网合成甲状腺球蛋白前体，至高尔基复合体加工成甲状腺球蛋白，并形成浓缩分泌颗粒，以胞吐方式排放到滤泡腔内贮存。滤泡上皮同时从血中摄取碘离子（I^-），后者经细胞内过氧化酶作用而活化，再进入滤泡腔与甲状腺球蛋白结合，形成碘化甲状腺球蛋白。在脑垂体分泌的促甲状腺素作用下，滤泡上皮细胞可将碘化的甲状腺球蛋白重吸收入胞质，形成胶质小泡，后者与溶酶体融合，其内的甲状腺球蛋白被分解成三碘甲状腺原氨酸（T_3）和四碘甲状腺原氨酸（T_4），两者合称甲状腺素。

甲状腺素能促进机体新陈代谢，提高神经兴奋性，促进生长发育；对婴幼儿的骨骼发育和中枢神经系统发育影响尤为重要。小儿甲状腺功能低下可导致身材矮小，智力低下，称呆小症。成人甲状腺功能低下则引起新陈代谢率降低，毛发稀少，精神呆滞和黏液性水肿，称甲低。甲状腺功能亢进时，甲状腺素分泌增多，导致甲状腺功能亢进症，简称甲亢。

2. 滤泡旁细胞

滤泡旁细胞位于滤泡之间和滤泡上皮细胞之间，单个或成群分布，数量较少。滤泡旁细胞体积较大，HE 染色胞质着色浅，银染法可见胞质内有嗜银颗粒。电镜下，位于滤泡上皮中的滤泡旁细胞顶部胞质被相邻的滤泡上皮细胞所覆盖。滤泡旁细胞能以胞吐方式释放颗粒内的降钙素。降钙素是一种肽类激素，可抑制破骨细胞溶解骨质，使骨骼释放钙减少，从而降低血钙浓度。血钙浓度增高时，可刺激降钙素的释放。

甲状旁腺

甲状旁腺与甲状腺名字只有一字之差，而甲状旁腺的发育与甲状腺的发育起源却完全不同。人胚发育时原始咽向外形成5对咽囊。第3对咽囊背侧份上皮细胞增生，迁移至甲状腺原基背侧，分化为下一对甲状旁腺。第4对咽囊背侧份细胞增生，迁移至甲状腺原基背侧，分化为上一对甲状旁腺。所以，最终发育成熟的甲状旁腺位于甲状腺背面，包括上、下两对，呈扁椭圆形。腺表面有薄层结缔组织被膜，实质内腺细胞排列成索团状，细胞分主细胞和嗜酸性细胞两种。

1. **主细胞**

主细胞数量较多，体积较小，呈圆形或多边形，核圆，位于细胞中央，HE染色胞质着色淡。电镜下，胞质内含粗面内质网、高尔基复合体、膜包分泌颗粒和一些糖原、脂滴等。主细胞合成和分泌甲状旁腺素，主要作用于骨细胞和破骨细胞，使骨盐溶解，并能促进肠及肾小管吸收钙，使血钙升高。甲状旁腺素和降钙素共同维系机体血钙恒定值。

2. **嗜酸性细胞**

嗜酸性细胞于青春期开始出现，并随年龄的增加而增多。细胞体积较大，核小，染色深，胞质嗜酸性强，单个或成群存在于主细胞之间。电镜下可见胞质内含线粒体。此细胞功能尚不明，有人认为它可能是老化的主细胞。

甲状旁腺素和降钙素共同维系机体血钙恒定有重要意义，它们的过多或过少都会引起严重后果。已有报道认为1型多发性内分泌肿瘤（MEN1）是一种具有染色体显性遗传倾向的肿瘤综合征。基于对MEN1患者肿瘤的杂合性丢失的研究和对患者家族进行基因连锁分析，确定了MEN1基因位于染色体11q13，它是一种肿瘤抑制基因，编码蛋白质Menin。目前，MEN1基因的突变被认为是导致甲状旁腺肿瘤发生的几个主要因素之一。

肾上腺

肾上腺表面包有被膜，被膜结缔组织伴随血管和神经深入腺实质。肾上腺实质由周边的皮质和中央的髓质两部分构成，两者在发生上来自不同的胚层，故在结构和功能上均不相同。

1. 肾上腺皮质的发育

皮质来源于胚胎时期的体腔上皮。第4周，位于中肾头端的体腔上皮细胞增殖向间充质增生并聚集成团，形成胎儿肾上腺皮质原基，发育为胎儿肾上腺皮质。第7周时，肾上腺皮质原基逐渐脱离体腔上皮，并出现外侧的被膜。7周胚已可分辨胎儿皮质和永久皮质，此时皮质由胎儿皮质细胞组成，细胞特点呈体积大，呈多边形；核大，圆形，核仁明显；胞质嗜酸性，糖原较少。细胞排列成索状并相互交织成网，细胞索间有血窦，具备内分泌器官的结构特征。

胚胎发育到第7周半时，在肾上腺被膜下开始出现薄层细胞，特点是细胞小，排列紧密，胞质量少，嗜碱性，胞质内含大量糖原颗粒，是永久皮质的原始细胞，这些细胞形成帽状结构，包围胎儿皮质。

从第8周开始，皮质迅速发育，主要是胎儿皮质明显增厚，细胞体积增大，核大染色浅，胞质嗜酸性增强，细胞排列成束状。第8～10周，在腺体中央出现腔小、壁薄的中央静脉，管壁仅由内皮与少量结缔组织构成。在皮质细胞间夹有大小不等的迁移细胞团，部分细胞团已分布于中央静脉周围。

第13周时，胚胎肾上腺皮质细胞胞质内出现丰富的滑面内质网、线粒体嵴为管状或泡状，脂滴量少，相邻细胞间可见紧密连接。永久皮质厚度变化不大，但10周后胞质内糖原减少。

第14～15周时，永久皮质细胞逐渐排列成团状，细胞团间有血窦。第16～18周时，在永久皮质与胎儿皮质交界处，部分胎儿皮质细胞呈退化现象，核固缩深染，核周胞质空泡化，但是胎儿皮质总体明显扩张，占整个皮质的70%；永久皮质帽的细胞开始发育分化。细胞排成

拱状，核致密，滑面内质网增多。

第15周时永久皮质开始分化，出生时初级球状带和束状带已形成，网状带未出现。

第19～25周时，胎儿皮质继续增厚，靠近胎儿皮质的永久皮质细胞增生并向深部扩展，呈条索状排列，垂直于被膜。随胎龄的增加，这些永久皮质细胞胞体增大，胞质增多，胞质嗜碱性减弱，内滑面内质网、粗面内质网及游离核糖体丰富，脂滴增多。

第26～38周时，永久皮质厚度增加不明显，仍以胎儿皮质为主，靠近髓质的胎儿皮质细胞索在髓质周呈放射状排列，索间有丰富的血窦。

分娩以后的新生儿，其永久皮质细胞较小，核圆形，核质比例大，细胞排成团状或马蹄形，细胞团之间有血窦；深层的永久皮质细胞较大，成束排列，束间有与被膜垂直纵行走向的血窦，似成人的球状带和束状带。胎儿皮质仍占皮质的大部分，部分胎儿皮质细胞呈退化现象。

2. 肾上腺髓质的发育

胚胎发育到第7周时，神经嵴细胞开始迁入肾上腺，迁移而来神经细胞出现在被膜内、嵴处，形成神经母细胞结节，结节从胚胎第8周起逐渐增多，一般由7～10个神经母细胞组成，常呈椭圆形或球形，排列成巢状或菊花形团状结构，可发育为交感神经和嗜铬细胞。神经母细胞结节以内陷的方式从胎儿皮质逐渐向髓质迁移，在胚胎第15～18周达高峰。部分细胞发育为嗜铬母细胞，呈圆形或椭圆形，其胞体均小于永久皮质细胞与胎儿皮质细胞；核圆形，核内染色质密集，HE染色呈深紫蓝色，胞质量少。这些细胞在胎儿皮质下方形成髓质，由结缔组织分隔。有人观察到甚至出生时仍有少量神经嵴细胞向肾上腺内迁移发育。

第12周髓质区已有较多的嗜铬母细胞团。在细胞团周围已观察到分化的嗜铬细胞，细胞体积较大，呈多边形或椭圆形，核大而圆，胞质染色浅。第13周半时，这些嗜铬细胞胞质内出现细小的嗜银颗粒，电镜观察胞质内有较多的圆形或椭圆形膜被颗粒，颗粒可分两种类型：一种颗粒内有电子致密度低的絮状物质；另一种颗粒内有电子致密度高的核心，与界膜间有明显的晕。交感神经节细胞分化较晚，自16周以后

在嗜铬细胞之间可见少量单个或小群的交感神经节细胞，胞体大，有突起，胞质嗜碱性，细胞核大而圆，呈空泡状，核仁清楚。电镜下细胞核周围有丰富的粗面内质网，游离核糖体以及线粒体，胞突内有较多的微丝。

第19～38周时，在皮质细胞间夹杂有迁入的嗜铬母细胞团，但随胎龄的增加，迁入的细胞团逐渐减少，皮质或皮质下结节数逐渐减少。髓质的神经母细胞逐渐分化成熟，中央静脉出现分支，腔大，内皮外已可见2～4层平滑肌细胞。

肾上腺发育时，皮质中偶有神经母细胞成分残留，且胚胎肾上腺皮质中神经母细胞的组织结构与原位神经母细胞瘤相似，因此有学者推论，胚胎中期的肾上腺分化延滞可能是神经母细胞瘤发病原因，神经母细胞结节的自然分化是神经母细胞瘤逆转的主要机制。

新生儿刚出生时肾上腺髓质体积小，位于肾上腺中央；嗜铬细胞数量多，成群分布于中央静脉周围；交感神经节细胞数量少，单个或成群散在嗜铬细胞之间。此时，在髓质和皮质内仍有少量的嗜铬母细胞团。

成人发育完善的肾上腺分为皮质和髓质两部分。

（1）皮质　皮质占肾上腺体积的80%～90%，由浅入深分为3个带，球状带、束状带和网状带。

①球状带紧靠被膜下方，较薄，占皮质总体积的约15%。细胞多排列成团球状，细胞体积小，呈矮柱状或多边形，核小，染色深，胞质内含少量脂滴。球状带细胞可分泌盐皮质激素，如醛固酮，主要作用是通过促进肾的远曲小管和集合小管重吸收 Na^+ 及排出 K^+、刺激胃黏膜吸收 Na^+ 等作用，从而调节钠、钾的代谢，维持血容量。

②束状带位于球状带内侧，是皮质中最厚的部分，占皮质总体积约78%。束状带细胞常排列成单行或双行成细胞索，细胞体积大，呈多边形，胞质内含大量脂滴，在HE染色标本中着色浅，呈泡沫状。束状带细胞分泌糖皮质激素，如皮质醇和皮质酮，主要作用是促使蛋白质及脂肪分解并转变成糖，还可抑制免疫应答和抗炎症等。

③网状带位于束状带内侧，邻近髓质，占皮质总体积约7%。细胞排列成索并相互吻合成网。细胞体积大，核小，着色深，胞质内有少量

的脂滴和较多的脂褐素。网状带细胞合成及分泌雄激素，主要是脱氢异雄酮和少量雄甾烯二酮，此外，网状带细胞还可分泌少量糖皮质激素。

肾上腺皮质细胞分泌的激素均属类固醇。脑垂体远侧部细胞分泌的促肾上腺皮质激素可调节其分泌活动。

（2）髓质　髓质占肾上腺体积的10%～20%，位于肾上腺深部，主要由排列成索或团的髓质细胞组成。细胞体积较大，呈多边形，用含铬盐的固定液固定标本，胞质内可见黄褐色的嗜铬颗粒，故髓质细胞又称为嗜铬细胞。此外，髓质内还可见散在的交感神经节细胞。电镜下，可将髓质细胞分为两种，一种为肾上腺素细胞，数量较多，颗粒内含肾上腺素；另一种为去甲肾上腺素细胞，数量较少，颗粒内含去甲肾上腺素。肾上腺素和去甲肾上腺素均为儿茶酚胺类物质，肾上腺素可使心肌收缩力加强，心率加快，并使心脏和骨骼肌血管扩张；去甲肾上腺素具有很强的血管收缩作用，可使全身小血管收缩，血压升高。

肾上腺内毛细血管丰富，皮质和髓质的血窦相连续，后者汇集为中央静脉出肾上腺。由皮质进入髓质的血液含较高浓度的皮质激素，其中糖皮质激素可以增强肾上腺素细胞内N－甲基转移酶活性，使去甲肾上腺素甲基化，成为肾上腺素。由此可见肾上腺皮质和髓质在功能上是密切相关的整体。

垂　体

垂体为椭圆形小体，外包结缔组织被膜，实质由腺垂体和神经垂体两部分组成。腺垂体和神经垂体有不同的起源。

人胚早期发生先分化形成内胚层、中胚层和外胚层，垂体来自外胚层。在胚分化形成脊索后，会诱导其背侧中线的外胚层细胞增厚呈板状，称为神经板。神经板随脊索的生长而增长，并且头侧宽于尾侧。神经板中央沿长轴形成神经沟，沟两侧边缘隆起称为神经褶，两侧神经褶在神经沟中段靠拢并愈合，愈合且向两端延伸，从而使神经沟封闭为神经管。神经管两侧的表面外胚层在管的背侧靠拢并愈合，进而使神经管

居于表面外胚层的深面。神经管进一步分化为中枢神经系统，以及神经垂体、松果体和视网膜等。在神经褶愈合过程中，它的一些细胞迁移到神经管背侧成一条纵行细胞索，继而分裂为两条细胞索分别位于神经管的背外侧，称神经嵴，它可分化为周围神经系统及肾上腺髓质等结构。位于体表的表面外胚层，将分化为皮肤的表皮及其附属器，以及腺垂体、牙釉质等的上皮。所以，神经垂体起源于神经外胚层，而腺垂体起源于表面外胚层。

具体来说，腺垂体分化自原始口腔，神经垂体分化自神经垂体芽。胚胎发育至第 3 周，口凹顶的外胚层上皮向背侧下陷，形成一囊状突起，称拉特克囊（rathke pouch）。稍后，间脑的底部神经外胚层向腹侧突出，形成一漏斗状突起，称神经垂体芽（图 15）。拉特克囊和神经垂体芽逐渐增长并相互接近，第 2 月末，拉特克囊的根部退化消失，其远端长大并与神经垂体芽相贴。之后，囊的前壁迅速增大，形成垂体前叶，即腺垂体远侧部。从垂体前叶向上长出一结节状突起并包绕漏斗柄，形成垂体的结节部。囊的后壁生长缓慢，形成垂体的中间部。囊腔大部消失，只残留一小的裂隙。神经垂体芽的远端膨大，形成神经垂体；其起始部变细，形成漏斗柄。腺垂体中分化出多种腺细胞，神经垂体主要由神经纤维和神经胶质细胞构成。下丘脑视上核和室旁核的神经元轴突自第 10 周进入垂体漏斗，在第 12 周末到达垂体神经部。在垂体漏斗及神经部分化形成的同时，神经胶质细胞分化为垂体细胞。

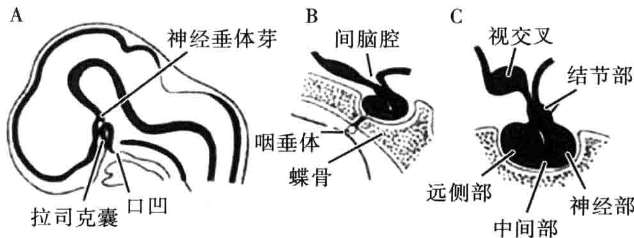


图 15　垂体的发生

最终，垂体的实质包括腺垂体和神经垂体。腺垂体分为远侧部、中间部和结节部 3 部分；神经垂体分为神经部和漏斗部两部分，漏斗与下丘脑相连。远侧部又称前叶，中间部和神经部合称后叶。

1．腺垂体

（1）远侧部　远侧部腺细胞排列成团索状，细胞间有丰富的窦状毛细血管和少量的结缔组织。腺细胞根据其在 HE 染色片中着色不同，可分为嗜色细胞和嫌色细胞两大类。嗜色细胞又分为嗜酸性细胞和嗜碱性细胞，两者均具有含氮激素分泌细胞的超微结构特点。根据腺细胞所分泌激素种类的不同，可以进一步分类并借此命名。

①嗜酸性细胞：数量较多，呈圆形或椭圆形，胞质内因含有粗大的嗜酸性颗粒而被伊红染成粉红色。根据嗜酸性细胞所分泌激素种类的不同，可分为生长激素细胞和催乳激素细胞两种。生长激素细胞，数量占多数，所分泌的生长激素能促进机体多种代谢过程，尤其能刺激骺软骨生长，使长骨增长。幼年时期若生长激素分泌不足，可导致垂体侏儒症，分泌过多则引起巨人症；成人生长激素分泌过多则导致肢端肥大症。催乳激素细胞存在于男、女两性垂体中，但在女性较多，于妊娠期和哺乳期细胞功能旺盛。该细胞所分泌的催乳素能促进乳腺发育和乳汁分泌。

②嗜碱性细胞：数量较少，呈椭圆形或多边形，胞质内含嗜碱性颗粒。嗜碱性细胞可分促甲状腺激素细胞、促肾上腺激素细胞、促性腺激素细胞 3 种。促甲状腺激素细胞所分泌的促甲状腺激素能促进甲状腺激素的合成和释放。促肾上腺激素细胞分泌促肾上腺皮质激素，主要促进肾上腺皮质分泌糖皮质激素。促性腺激素细胞分泌卵泡刺激素和黄体生成素，前者在女性促进卵泡发育，在男性则刺激生精小管支持细胞合成雄激素结合蛋白，以促进精子发生；后者在女性可促进排卵和黄体形成，在男性则刺激睾丸间质细胞分泌雄激素，故又称间质细胞刺激素。

③嫌色细胞：数量多，呈圆形或多边形，体积小，着色浅，胞质量少，细胞界限不清。电镜下可见胞质内有少量分泌颗粒。推测嫌色细胞可能是嗜色细胞的前身或是脱颗粒后的嗜色细胞。

（2）中间部　是位于远侧部和神经部之间的一纵形狭窄区域，仅占垂体体积的 2%，由嫌色细胞、嗜碱性细胞和大小不等的滤泡组成，滤泡内含胶质，功能不清。

（3）结节部　包绕神经垂体漏斗柄，前方较厚，后侧较薄。此部含有丰富的纵行毛细血管和位于血管周围的腺细胞，后者以嫌色细胞为主，其间有少量嗜酸性和嗜碱性细胞。

（4）垂体门脉系统　由垂体门静脉及其两端的毛细血管网共同构成。大脑基底动脉环发出的垂体上动脉经结节部上端进入神经垂体漏斗，在此处形成第一级毛细血管网，后者汇集成数条垂体门静脉下行至远侧部，再度分支并吻合形成第二级毛细血管网。远侧部的毛细血管最后汇集成小静脉注入垂体周围的静脉窦。

（5）下丘脑与腺垂体的关系　下丘脑弓状核等神经核团的神经元具有内分泌功能，称为神经内分泌细胞，这些细胞分泌的激素经轴突运输并释放至漏斗处的第一级毛细血管网，继而经垂体门脉系统到达腺垂体远侧部的第二级毛细血管网，调节远侧部各种腺细胞的分泌活动。这些激素中，对垂体腺细胞分泌起促进作用的，称释放激素；对腺细胞分泌起抑制作用的，称释放抑制激素。目前已知的释放激素及释放抑制激素有：生长激素释放激素和生长激素释放抑制激素、催乳激素释放激素和催乳激素释放抑制激素、促甲状腺激素释放激素、黑素细胞刺激素释放激素、促肾上腺皮质激素释放激素、促性腺激素释放激素、黑素细胞刺激素释放激素等。

下丘脑通过分泌释放激素和释放抑制激素调节腺垂体内各种细胞的分泌活动。同时，腺垂体所产生的各种促激素又可以调节甲状腺、肾上腺和性腺的分泌活动，如此，神经系统和内分泌系统共同完成对机体的多种物质代谢及功能的调节。这样的功能调节方式与它们发生时的密切关系也是分不开的。

2. 神经垂体

神经垂体与下丘脑直接相连，两者在结构和功能上是一个统一体。下丘脑前区的视上核和室旁核含有大型神经内分泌细胞，其轴突经漏斗直接抵达神经部，构成下丘脑垂体束，同时也是神经垂体无髓神经纤维的主要来源。

视上核和室旁核内的大型神经内分泌细胞所含的分泌颗粒沿轴突被

运送至神经部，在轴突沿途，这些分泌颗粒常聚集成团，使轴突呈串珠样膨大，于光境下显示为大小不等的弱嗜酸性团块，称赫令体。神经部无髓神经纤维之间含有丰富的窦状毛细血管，此外还可见分布于无髓神经纤维周围的神经胶质细胞，后者又称垂体细胞，细胞大小、形态不一，并有突起附于毛细血管壁上。垂体细胞具有支持、营养神经纤维的作用。

视上核和室旁核的神经内分泌细胞合成抗利尿激素和催产素。抗利尿激素（又称升压素）的生理作用是提高远曲小管和集合管对水的通透性，促进水的吸收，从而使尿液浓缩，尿量减少；催产素能促进临产孕妇的子宫收缩，帮助分娩。抗利尿激素分泌减少时，可引起尿崩症，患者由于排尿量异常增多，可导致小动脉平滑肌收缩，血压升高。

松果体

松果体为扁圆锥形小体，连于第三脑室。松果体表面有软脑膜包绕，软脑膜结缔组织伴随血管深入腺实质将其分隔成大小不等的小叶，小叶由松果体细胞、神经胶质细胞和无髓神经纤维组成。

松果体的发生。胚胎第 7 周，间脑顶部向背侧突出，形成一囊状突起，是为松果体原基。囊壁细胞增生，囊腔消失，形成一实质性松果样器官，即松果体。其中的松果体细胞和神经胶质细胞均由神经上皮分化而来。

松果体细胞呈圆形或不规则形，核大，胞质少，HE 染色呈弱嗜碱性。镀银染色切片中，可见细胞伸出长短不一的突起，终止在邻近细胞中间或血管周围。电镜下可见松果体细胞具有含氮激素分泌细胞的超微结构特点，胞质内常见小圆形分泌颗粒。松果体细胞分泌褪黑素，参与调节机体的昼夜生物节律、睡眠、情绪、性成熟等生理活动。

总而言之，内分泌系统器官的发育没有统一的规律，略有相同之处，比如肾上腺髓质和神经垂体的发育过程中都有神经元的精妙迁人。内分泌器官都可以分泌特殊的激素，以血液为高速通道，迅速到达遥远

的靶标，可谓是一支精悍的远程作战之师！

（金晓航）

参考文献

[1] Jamilloux Y, Favier J, Pertuit M, et al. A MEN1 syndrome with a paraganglioma. Eur J Hum Genet, 2014, 22: 283－285

[2] Colicchia M, Campagnolo L, Baldini E, et al. Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. Hum Reprod Update, 2014

[3] Refetoff S, Bassett JH, Beck－Peccoz P, et al. Classification and proposed nomenclature for inherited defects of thyroid hormone action, cell transport, and metabolism. Thyroid, 2014, 24: 407－409

[4] Nicolaides NC, Charmandari E, Chrousos GP, et al. Circadian endocrine rhythms: the hypothalamic－pituitary－adrenal axis and its actions. Ann NY Acad Sci, 2014, 1318: 71－80

[5] Mracsko E, Liesz A, Karcher S, et al. Differential effects of sympathetic nervous system and hypothalamic－pituitary－adrenal axis on systemic immune cells after severe experimental stroke. Brain Behav Immun, 2014, Jun 2. pii: S 0889－1591

[6] Horie Y, Shimizu A, Adachi S, et al. Expression and localization of gonadotropic hormone subunits (Gpa, Fshb, and Lhb) in the pituitary during gonadal differentiation in medaka. Gen Comp Endocrinol, 2014, 204C: 173－180

[7] Hu CP, Zou JT, Zou YQ, et al. Kidney－tonifying recipe can repair alterations in adrenal medullary chromaffin cells in asthmatic rats. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 542－621

[8] Knowles PJ, Douglas SA, Bunn SJ. Nicotinic stimulation of catecholamine synthesis and tyrosine hydroxylase phosphorylation in cervine adrenal medullary chromaffin cells. Neuroendocrinol, 2011, 23: 224－231

[9] Morante J, Vallejo DM, Desplan C, et al. Conserved miR－8/miR－200 defines a glial niche that controls neuroepithelial expansion and neuroblast transition. Dev Cell, 2013, 27: 174－187

[10] Feng G, Yi P, Yang Y, et al. Developmental stage－dependent transcriptional regulatory pathways control neuroblast lineage progression. Development, 2013, 140:

3838 - 3847

[11] Ben - Awadh AN, Delgado - Calle J, Tu X, et al. Parathyroid hormone receptor signaling induces bone resorption in the adult skeleton by directly regulating the RANKL gene in osteocytes. Endocrinology, 2014: n20141046

专题 11

细胞迁移

——泌尿和生殖系统的发育

泌尿系统和生殖系统在发生上密切相关，它们的主要器官肾与生殖腺均起源于中胚层。泌尿系统最初仅仅具有形态而无实质性功能，经过几个阶段的复杂发育过程才最终形成永久肾，具备泌尿功能。在这之后，生殖系统才开始发育：即性腺（包括睾丸和卵巢）的发生、生殖道的发育晚于性腺的发育。哺乳动物的性腺是由生殖细胞和体细胞两类细胞组成的，原始生殖细胞（PGC）来源于胚胎发育早期的上胚层，然后经过定向迁移到达生殖嵴（genital ridge），与生殖嵴体细胞共同发育为性腺。哺乳动物的性别决定发生在原始生殖细胞完成迁移以后，生殖嵴的体细胞在性别决定和性别分化过程中发挥重要作用。随着性别决定的完成，生殖细胞的命运也会发生改变，在雄性个体中发育为精子，在雌性个体中发育为卵子。性别决定和分化是一个受多种因素精细调控的复杂过程，特别是体细胞与生殖细胞之间的相互作用发挥关键作用。性腺发育早期出现异常在临床上会导致生殖细胞肿瘤、性腺分化异常和性别逆转等疾病。

肾的发育

胚胎第4周开始，体节外侧的间介中胚层逐渐向腹侧移动并于体节分离，形成一对纵行的条索状结构称为生肾索（nephrogenic cord），至胚期第5周，生肾索体积增大，开始向后突向体腔，于脊柱两侧形成对称的两条纵行隆起，称为尿生殖脊（urogenital ridge），后者是泌尿和生殖系统的发育原基。在人胚发育过程中，肾的发生根据其发生时间顺序分为前肾（pronephros）、中肾（mesonephros）和后肾（metanephros），前肾和中肾是暂时性的器官，在胚胎发育过程中相继退化，后肾则发育为永久性肾。从生理学观点来说，哺乳动物的前肾似乎无功能，但它对中肾、后肾的发育是必需的先导环节。中肾似乎是有功能的，其肾小管已血管化，并产生尿液。中肾的功能对不同种类的哺乳动物有不同的意义。对于人类来说，中肾的功能在维持羊膜液正常循环过程中起重要作用，而羊膜液对其他器官（如肺）的发育是必需的。中肾对所有雌、雄两性脊椎动物生殖道的形成是必需的。哺乳动物后肾发育成有功能的成年肾。后肾在调节水和电解质动态平衡过程中起决定性作用，同时还排出代谢废物，分泌许多重要激素。后肾发育异常可引起多种先天性肾疾病。

胚肾的发生过程比较复杂，在胚期第4周，人胚颈部一些细胞簇和弯曲的前肾小管构成前肾，尾部开口在泄殖腔。前肾于第4周末开始退化，此时中肾管顶端的细胞开始增殖，同时向间介中胚层末端移动，形成中肾管；相对于发育简单的前肾管，中肾管发育得更好、更完备，它由中肾小体和中肾小管构成，在后肾发育前具有一定的泌尿功能。中肾在人胚体的位置是逐渐下移的，以后中肾小管将发育为睾丸的输出小管，而中肾管则演变为部分男性生殖道。后肾在人胚期第5周初开始发育，再经历4周后即具有泌尿功能并一直持续下去，所以后肾又被称为永久肾。后肾的发育过程较为复杂：中肾管开口于泄殖腔的部位出现一个芽状突起，称为输尿管芽（ureteric bud），输尿

管芽的出现是后肾开始发育的标志。后肾的另一个组织来源是生后肾原基（metanephrogenic blastema），输尿管芽与生后肾原基在后肾的发育过程中相互诱导、相互影响，构成一个功能上的统一体。输尿管芽是输尿管（ureter）、肾盂（pulvis）、肾盏（calyx）和集合小管（collecting tubule）的原基。每个集合小管的盲端膨大，并诱导生后肾原基上的一部分间充质细胞富集到其表面，形成后肾小泡（metanephric vesicle），后者最后拉伸为S形小管，形成后肾小管（metanephric tubule）。随着后肾发育的进行，后肾小管的一端与集合小管相连，另一端则与血管形成有关，构成肾小球的主体。靠近肾小球的肾小管为近端小管，相反肾小管远侧端则为远端小管，两者之间的一部分肾小管生长迅速并蜿蜒盘曲形成髓襻（medullary loop）。在人胚发育过程中，输尿管芽要进行约15次的反复分支，最终形成300 000～1000 000个肾单位。

后肾的发育调控

在肾的发育过程中，输尿管芽出芽是关键步骤，如果出芽失败，肾则不能发育，如果出芽位置错误，异位输尿管将不能与膀胱成功相连。最新研究显示，后肾间充质与输尿管芽之间的相互诱导，并不需要两者细胞的紧密接触，仅由两者释放的可溶性因子即可发挥相互诱导作用。影响肾发育的因素主要包括细胞因子、细胞外基质，以及介导细胞与细胞因子和细胞外基质相互作用的中介物。

1. 细胞因子及其受体

许多细胞因子参与了肾的发育过程，如GDNF、肝细胞生长因子（HGF）、表皮生长因子（EGF）和转化生长因子TGF-β，转化生长因子（TGF）可促进内髓集合管肾上皮细胞（IMCD）形成分支管状结构；TGF-β则抑制集合管分支，但不影响集合管延长；骨形成蛋白（bone mot-phogenetic proteins，BMP）也可调节集合管分支过程，BMP-2和高浓度BMP-7明显抑制集合管形成分支，而低浓度BMP-7可促进集

合管分支。

（1）在众多的调节肾发育的细胞因子中，GDNF/GFRa1/RET 信号通路无疑是最关键的一条通路。GDNF 是转化生长因子 - β（TGF - 13）超家族的一个亚家族中的一员，属于半胱氨酸（Cys）蛋白家族，活性形式为同源二聚体。在胚肾中，GDNF 由后肾间充质细胞表达释放。肾成熟后，肾内 GDNF 水平迅速降低到约为胚肾的 1/27。GDNF 亚家族受体系统由两部分构成，一部分为共同受体 GFRa 1 ~4，另一部分为跨膜受体 RET。胚肾的中肾管、输尿管芽表达 RET 和 GFRM ，而成年动物的集合管只表达 GFRa1。在同时表达 GFR 1 和 RET 蛋白的细胞中，配体 GDNF 先与共同受体 GFRa1 结合形成 GDNF/GFR 复合物，再与 RET 受体的胞外区结合，启动胞内区的酪氨酸残基磷酸化，激活 RET 下游信号通路，包括 Ras/Erk MAP kinase、PI3 - kinase/Akt、PLC - γ/calcium 通路。其中 Ras/Erk MAPkinase 通路主要促进输尿管芽分支，对输尿管芽延伸影响较小，PI3 - kinase 通路的抑制可完全阻断输尿管芽生长。已有证据显示，GDNF/GFRa1/RET 信号通路可以调节多个关键基因的功能：Wnt11 基因，是输尿管芽顶端的另一个特异基因，形成同样的正反馈环，Wnt11 信号有助于后肾间充质细胞维持 GDNF 表达。Spry1 基因，该基因表达细胞内酪氨酸激酶信号负性调节因子，形成负反馈环，调节输尿管芽生长和分支。在胚肾发育后期，缺乏 Spry1，将导致输尿管芽表达的 Wnt11 以及后肾间充质表达的 GDNF 增多，导致输尿管芽发育得过多过大。GDNF 及其受体 RET、GFRa1 基因失活均可使输尿管芽形成及分支障碍，导致肾发育不良，甚至不能发育。由此可见，GDNF 信号不仅对于诱导中肾管出芽和促进新芽早期生长和分支是重要的，对于输尿管芽连续分支，直至肾发育完全也是至关重要的。

（2）胚肾表达纤维生长因子（fibroblast growth factors，FGF）家族多个成员，FGF - 7 和 FGF - 10 与输尿管芽分支形成有关，FGF - 7 和 FGF - 10 表达于输尿管芽周围的肾基质细胞，其高亲和力受体 FGFR - 2 表达于输尿管芽上皮细胞。FGF - 7 和 FGF - 10 以高亲和力与酪氨酸激酶受体 FG - FR2b（FGF receptor 2b）结合，激活下游信号通路，调节输尿管芽生长和肾单位形成的数量。缺乏 FGF - 7 或 FGF - 10 小鼠的

肾明显小于正常小鼠。FGF－7 基因敲除小鼠的肾仅形成少量肾单位，输尿管芽分支减少。离体的输尿管芽培养系统显示FGF－7 引起的输尿管芽以紧凑的方式分支，无明显的茎柄和壶腹，FGF－10 则刺激形成长茎柄和明显的壶腹。FGFR$^{-/-}$胚胎在肾发育前即死亡。以上结果表明，FGF 系列生长因子对于输尿管芽分支形成非常重要。

（3）当间充质细胞与输尿管芽以及脊索共同培养时，表皮生长因子（EGF）能诱导后肾间充质分化成基质细胞，刺激基质细胞间隔区扩大，这一实验结果提示后肾间充质存在 EGF 受体但是 EGF 在胚肾发育中的确切作用，还有待于进一步研究。转换生长因子（transforming growth factor－alpha，TGF－α）是 EGF 家族的另一成员，在胚肾中合成和分泌，它也结合于 EGF 受体，提示 TGF/EGFR 复合物参与胚肾发育的调节。

2. 肾分化调控的关键基因

在肾分化的研究中，一个新的焦点在于鉴定肾分化调控相关基因及其特征，这些基因调控肾细胞增殖、肾形成状态以及正常肾和异常肾在起源上的差别。

（1）WT－1（Wilm's tumor－associated gene）是早期肾分化调节基因，为正常肾发育所必需的，在分化的泌尿生殖系统中表达。WT－1 具有双重功能，既是上皮分化诱导剂，又是抑癌基因。WT－1 作为上皮分化诱导剂，能启动上皮分化程序，参与肾间质细胞的诱导和存活，阻止未分化的间质细胞增殖，促使它们向特异的上皮细胞移行。WT－1 又是抑癌基因，通过诱发细胞凋亡而抑制肿瘤，该基因胚系突变导致 Wilm 幼年肾癌和泌尿生殖系统畸形。WT－1 编码一种具有锌指结合结构域的转录因子，通过在转录水平调控大量与生长分化相关的基因，持续发挥作用，已知的靶基因有胰岛素样生长因子Ⅱ（IGF－Ⅱ）、血小板源生长因子 α 链（PDGF－α）、桑葚胚黏着蛋白（uvomorulin）、整合蛋白（integrinα8）转化生长因子 β（TGF－β）和视黄酸受体 α（RAR－α）等。

（2）Pax－2 亦是早期肾分化调控基因，出生后不表达。Pax－2 编码的转录因子含有一个 DNA 结合结构域和一个反式激活结构域，可与

其他核蛋白相互作用。Pax－2在增殖的上皮细胞前体（间质细胞和输尿管芽衍生物）中表达最高，它是间质细胞的诱导标志，主要调节肾单位前体细胞增殖和中肾管形成。肾可能是唯一受Pax－2杂合突变影响的器官，Pax－$2^{+/-}$小鼠由于后肾间质和输尿管芽细胞增殖缺陷常致肾发育不全、输尿管上部减小。Pax－$2^{-/-}$小鼠完全缺失肾、输尿管和生殖道，不表达后肾管和输尿管的标志基因c－ret，在出生后1天内死亡，表明Pax－2基因在中胚层来源的结构分化中起关键作用。

（3）Wnt－4编码分泌型糖蛋白，是肾发育的正性调控因子，先后在中肾间质、皮层后间质、后肾中表达，调控肾间质向上皮转化。Wnt－4基因表达水平和组织状态有关，新生儿肾梗阻时，间充质不能向上皮转化，Wnt－4表达增高。在小鼠正常发育中，Wnt－4的mRNA在小鼠胚胎期增加，在出生后后肾器官已形成时下降。Wnt－4突变小鼠肾较小并退化，由未分化散在的输尿管芽后间质组成，在出生后24小时内死于肾衰。Wnt－4在后肾间质向上皮转化中为一个自激活因子，其作用异常可能导致Wilm肿瘤。原癌基因β连环蛋白（beta－catenin）是Wilm肿瘤中Wnt－4信号转导的下游靶基因，在Wilm肿瘤发生和控制肾正常发育的Wnt－4信号转导之间建立了直接联系。此外，WT－1、Pax－2和c－ret可能参与Wnt－4转录调控，在正常发育中，Wnt－4以c－ret信号转导为下游转导途径发挥作用。

（4）c－ret编码的酪氨酸激酶受体，是一种转导细胞生长和分化信号的细胞膜表面分子，是肾分化正性调控因子。c－ret通常在发育期的神经系统、后肾管和输尿管芽中表达，c－ret突变小鼠由于肾衰和缺乏消化道小肠神经元，在出生后1天内夭折，突变小鼠肾原基中可识别的肾成分数量减少，大部分为未分化的间质区，双侧或单侧肾发育不全，输尿管缺失。

（5）完整的肾素－血管紧张素系统对于肾分化极为重要，缺失血管紧张素转换酶的突变小鼠肾血管和肾小管异常，肾素合成过量，肾素异常分布于肾间质和肾血管细胞中，而天然肾素分布于肾近球细胞中。血管紧张素Ⅱ介导几种肾细胞的生长，它在肾早期发生时通过结合其受

体的两个亚型——AT1 和 AT2 发挥作用。AT2 在未分化的间质中表达较高，调节肾细胞增殖、凋亡及间充质上皮的转化。AT1 主要在持续分化的结构中表达，参与调节晚期肾血管发育、收缩和钠吸收，在终末分化完成之前，控制细胞运动和生长。

（6）骨形态发生蛋白 7（bone morphogenetic proteins 7，BMP－7）是一类 β 转移相关生长因子，在骨基质和其他几个与诱导相关的发育组织中表达。BMP－7 在维持肾结构完整方面有重要作用，为远曲肾小管发挥功能和正常发育所必需的。BMP－7 缺失的裸小鼠出生后不久便死亡，这些裸小鼠的肾较小，远曲肾小管发育较差，大多数 BMP－7 突变裸小鼠出生时至少存在单肾囊肿，存活数天后所有突变裸小鼠都出现囊肿。此外，BMP－7 在构建组织模型中起重要作用，可抑制细胞增殖、诱导细胞分化、延长细胞存活。

总之，胚肾的发育受多种因素的制约和调节，这些因素包括多种细胞因子的按特定的时空规律的表达，多种细胞外基质以及中介物质的相互作用。如果这些因素过强或过弱或时空错乱，将会导致肾发育不良或出现各种畸形，影响肾的功能甚至危及生命。

生殖腺的发育

性腺的出现与中肾密切相关，当中肾还是主要的泌尿器官时，中肾腹部表面就出现生殖腺嵴。性腺的发生主要来源于三类细胞：后腹部表面的间皮细胞、间皮细胞下方的间充质细胞和原始生殖细胞（PGC）。

人胚期第 3～4 周，靠近尿囊基部的卵黄囊内胚层里出现很多原始生殖细胞，后者以变形运动经背侧系膜向生殖嵴迁移并于第 6 周进入间充质。与此同时，生殖嵴表面上皮细胞受 PGC 诱导逐渐增厚形成初级性索又称髓质索（mudullar cord），在进一步发育过程中，初级性索渐与表面上皮分离，此时的生殖腺嵴是尚未分化的生殖腺，由皮质和髓质构成，两者均含有 PGC。人胚期 6 周末以前，尽管受精卵已经具有遗传

学性别（XY 或 XX），生殖腺的结构都是一样的，此阶段也被称为未分化性发育阶段。在以后的发育过程中，生殖腺逐渐生长变大，最终与相邻的中肾一起进入腹腔内。

Y 染色体短臂上有男性生殖腺发育所必需的基因，称为性别决定区（sex determining region，SRY），其翻译产生的蛋白质称为睾丸决定因子（testis determining factor，TDF）。人胚第 7 周，初级性索髓质在 TDF 作用下逐渐增厚，皮质却渐渐变薄，至第 8 周间皮和髓质之间的间充质分化为一层致密的白膜（tunica albuginea），后者的出现标志着胎儿睾丸开始形成。发育中的睾丸逐渐与正在退化的中肾分离，初级性索发育为睾丸索，后者发育为生精小管、直精小管和睾丸网。在 TDF 的作用下，生精小管之间的间充质细胞间质细胞（Leydig cell），人胚第 8 周开始，间质细胞开始分泌雄激素（睾酮和雄烯二酮）来维持中肾管的存在。在人胚第 8～12 周，胎盘分泌的人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadtrophin，HCG）达到高峰，从而促进睾丸分泌睾酮。此外睾丸的支持细胞（sertoli cell）产生抗中肾旁管激素（AMH），抑制中肾旁管的发育。青春期前生精小管呈实心状，主要由精原细胞（由迁移的 PGC 发育而来）和支持细胞组成；青春期后，睾丸上皮逐渐变得扁平，生精小管内管腔开始出现。睾丸网与残余的中肾小管相连，后者发育为输出小管，与中肾小管相连的间皮小管则发育为附睾管。睾丸分化是在 PGC 迁移入睾丸索后才发生的，早期睾丸支持细胞和 PGC 之间的相互作用对精子发生过程的正常进行非常重要，一旦 PGC 迁移入生殖腺嵴，上述两种细胞的相互作用抑制 PGC 的有丝分裂，同时阻止生殖细胞进入减数分裂（meiosis），直到青春期，减数分裂才开始。但是值得一提的是，无生殖细胞的突变小鼠仍能完成睾丸外形的发生，说明睾丸自身的分化并不依赖于 PGC。

XY 胚胎没有 SRY，所以不能合成 TDF，同时缺乏支持细胞、AMH、间质细胞和睾酮，所以胚胎向着女性方向发展。初级性索不断向着髓质生长，于胚期 10 周左右形成卵巢网（rete ovarii），随后退化消失，伴随而来的是次级性索（也成为皮质索，cortical cord）的增长，

PGC逐渐进入次级性索。至第16周，细胞索与上皮脱离形成原始卵泡，其中心是由PGC分化而来的卵原细胞（oogonium）。人胚第5个月，卵原细胞数目通过有丝分裂到达高峰（约为600万个），随后有丝分裂停止同时卵原细胞开始急剧退化。至第6个月，减数分裂开始，卵巢从真正意义上度过了未分化性腺阶段，此时女性内、外生殖器均已基本发育完成。胎儿出生时，卵巢内无卵原细胞，而都是第一次减数分裂形成的初级卵母细胞。有趣的是，初级卵母细胞进入减数分裂的网线期后即停止发育（减数分裂的停滞，meiotic arrest），直到青春期排卵之前，第一次减数分裂才继续进行，由网线期进入中期，并迅速完成减数分裂。在卵巢发育过程中，生殖嵴间充质细胞、体腔上皮细胞以及迁移的PGC之间的相互作用决定了卵巢和卵泡的正常发育。

生殖管道的发育

男、女两性胚胎一开始均具有两套生殖管道：中肾管（wolffian管）在男性生殖系统的发育过程中起重要作用；中肾旁管（müllerian管）则在女性生殖系统的发育过程中发挥关键作用。人胚第6~7周，胎儿支持细胞分泌抗中肾旁管激素，间质细胞则在第8周开始分泌睾酮，两者同时促进中肾管形成男性生殖道，中肾管头端发育为弯曲盘延的附睾管，与附睾远端相连的中肾管周间充质细胞形成发达的平滑肌，进而形成输精管；而中肾管尾端于第10周向外侧增长形成精囊腺，与精囊腺相连的中肾管末端则发育为射精管。人胚第10周，尿道前列腺部的内胚层细胞增长，开始逐渐突入周围的间充质，两者最终形成前列腺，并于第11周出现前列腺内腔和腺泡，于第13~15周，前列腺开始具有分泌功能。

人胚第6周，女性胚胎由于缺乏抗中肾旁管激素，在胸部第3体节处，中肾管外侧的间皮内陷形成纵沟并向尾部延伸，沟的边缘靠拢汇合形成中肾旁管。当中肾旁管生长到胎儿未来的盆腔位置时，左右中肾旁

管在中线合并成一个Y字形的子宫阴道原基（uterovaginal primordium），后者将发育为子宫和阴道。此外，中肾旁管头侧未融合部分发育为输卵管；两侧中肾旁管在末端的融合，把两个腹膜皱褶连接在一起，构成子宫阔韧带，并形成直肠子宫陷凹和膀胱子宫凹陷。在子宫周边和子宫阔韧带之间的间充质增殖分化为子宫旁组织。

生殖系统的发育调控

睾丸的发育和性别分化过程受到包括基因、激素和外界环境因素的综合调控，其间的相互联系、相互作用关系非常复杂。

1. SRY **基因**

性别决定基因SRY（sex - determining region of Y chromosome，SRY）位于Y染色体，是睾丸决定因子（testis - determining factor，TDF）的最佳候选基因，在人类性别决定中起关键作用，参与性腺的分化和发育，SRY基因的缺失及突变可导致基因功能丧失及性反转等疾病的产生。人的SRY基因位于染色体Yp11.3区域，为单拷贝基因，其开放阅读框包含1个外显子，可编码204个氨基酸的蛋白质。该蛋白质可分为3个区域，其中的79个氨基酸称为HMG盒（high mobility group box，HMG - box），SRY编码的HMG蛋白呈L形，以一种序列特异方式和DNA结合，这个区域的蛋白质可特异性识别并结合核心序列为AACAAAG的DNA序列，SRY蛋白结合DNA后还能引起DNA弯曲变形，将远距离的调节位点拉近，从而启动或抑制靶基因的转录，通过一系列信号转导作用导致胚胎早期睾丸的发育。人类生殖脊大约在妊娠33天形成，而SRY基因的表达可在妊娠41天的XY型胚胎内检测到，表达高峰的时间在妊娠44天后，此时睾丸索可辨认。此时SRY在睾丸支持细胞的前体细胞中表达，作为一个分子开关，使支持细胞的前体细胞向支持细胞（sertoli细胞）分化，支持细胞分化后产生某些生物活性物质影响睾丸及其细胞的分化与成熟。SRY基因的突变大多数位于HMG - box区域，但有少部分突变发生在HMG - box区域外，他们仍然

会引起完全性腺发育不全（complete XY gonada dysgenesis，CGD）。

2. SOX9 **基因**

SRY 相关 HMG - box 基因家族（SOX）的共性就是具有一个可以编码大约 79 个氨基酸的 HMG 保守序列。SOX9 基因是继 SRY 基因之后人们发现的第一个具有内含子的 SOX 家族成员，SOX9 基因最先是在人类一种躯干发育异常（campomelic dysplasin，CD）中发现的，该疾病的症状是软骨内成骨异常，进而导致长骨弯曲畸形同时伴有性别反转，由此可以推测导致 CD 综合征的基因同时也参与性别决定。深入研究发现，SOX9 基因的功能主要有：影响性别决定和分化，在胚胎发育过程中参与骨的形成，影响神经系统及胰腺的发育，另外，SOX9 基因也与肿瘤等疾病的发生有关。SOX9 基因缺失可以导致人类各种骨骼疾病，并发生性反转。SOX9 基因参与的性别决定机制目前还并不明确，有学者推测在人类性别决定中 SRY 基因并不是直接参与性别决定，而是通过 SOX3 和 SOX9 参与性腺分化的；在雌性中没有 SRY 基因，因此，SOX3 发挥作用抑制 SOX9 的功能，从而抑制了 SOX9 对睾丸决定的启动作用；而在雄性个体中 SRY 基因抑制了 SOX3，使 SOX9 作用得以发挥，参与睾丸决定。此外，在雌性个体中存在 DAX - 1 基因（位于 X 染色体 DSS - AHC 决定区的先天性肾上腺发育不良基因），该基因是雌性决定基因，SF - 1（类固醇生长因子）和 DAX - 1 可以形成二聚体，SF - 1 的活性受到抑制，SOX9 等次级调控基因不能转录表达，因此不能调控下级的性别决定反应，而在雄性个体中不存在 DAX - 1 基因，SOX9、SRY 等性别决定基因得以正常表达参与睾丸决定。

3. **肿瘤抑制基因** WT - 1

在受精 9.5 天胎鼠的间质中胚层即可检测到 WT1 的表达，此外睾丸支持细胞、卵巢颗粒细胞以及上皮细胞均有 WT1 表达。WT1 对睾丸索结构的维持是必需的，敲除该基因会导致睾丸索破坏和睾丸发育异常。在性腺发育期雄性、雌性大鼠 WT1 的表达量是一致的；敲除 WT1 可导致成年小鼠生精细胞全部凋亡，说明这个基因对精子发生过程至关重要。

4. GDF9（growth and differentiation factor 9）

GDF9 是早期卵巢分化所必需的一个生长因子，缺少它卵泡发育停

滞于初级卵泡阶段，初级卵泡细胞也不能进一步发育，进一步研究结果显示 GDF9 由初级卵泡细胞合成并作用于相邻的颗粒细胞，促使后者的分化。

5．抗苗勒管激素（AMH）

属于转化生子超家族成员之一。两性性腺细胞均可分泌 AMH，但分泌期的量均不同。在雄性由睾丸未成熟的支持细胞分泌，具有使雄性胚胎苗勒管退化的作用；在雌性，其主要由窦前卵泡和小窦卵泡的颗粒细胞分泌，与卵巢功能密切相关，并调控卵泡生长和发育。AMH 对两性性腺的发育起抑制作用。AMH 在男性性分化中主要是使苗勒管退化，并通过阻断睾丸 Leydig 细胞的分化减少类固醇激素酶，作用于睾丸的发育并影响其功能；出生后在涉及性腺发育、生殖细胞的调控和诱导睾丸下降方面也起了一定的作用。AMH 对早期精子的形成和成熟亦有调节作用。在女性，AMH 由出生后生长卵泡的卵巢颗粒细胞分泌，其抑制卵巢颗粒细胞上黄体生成激素受体及黄体酮的生物合成，调节卵子的发生及细胞的减数分裂，抑制颗粒细胞增殖和卵泡成熟，对成熟卵泡的选择有重要作用。AMH 还参与了从生长卵泡到成熟卵泡的另一次重要募集，即周期募集。AMH 抑制 FSH 刺激窦前卵泡生长，而且 AMH 缺陷鼠无论 FSH 高或低比野生型有更多卵泡生长，说明 AMH 缺乏的卵泡对 FSH 更敏感。每个卵泡因 AMH 等因子表达不同 FSH 阈值不同，窦前和小窦卵泡中 AMH 的表达差异，影响卵泡对 FSH 的反应性，从而影响卵泡的选择。

6．激素

在男性决定因子存在时，生殖峪上某些增殖细胞形成索状，从未来的睾丸门部呈放射状向外，这些将变为睾丸小管的 Sertoli 细胞。位于生殖索之间的生殖峪增殖细胞将成为性腺间质细胞或 Leydig 间质细胞。这些细胞在发育 60 天时首先见到。分化中的睾丸开始产生男性激素睾酮。脱氢表雄酮及苗勒管抑制物质（MIS）。间质细胞在约 9 周时分泌睾酮。睾酮及其衍生物双氢睾酮刺激尿生殖窦及外生殖器的分化。在发育早期睾酮产生是受绒毛膜促性腺激素（HCG）的刺激，后者由胎盘大量产生。随胎儿下丘脑 - 垂体轴的发育，在胎儿 LH 与 FSH 影响下，

胎儿间质细胞的发育，在胎儿 LH 与 FSH 影响下，胎儿间质细胞产生睾酮。在 16～20 周达到最高睾酮水平，正好与胎儿 LH 与 FSH 最大分泌量一致。

LH 与 FSH 的血浆浓度在妊娠后半期下降，出生时很低。充分发育的睾丸主要由大量卷曲的曲细精管组成。这些代表一个连续的管样结构，其功能是制造精子。曲细精管在睾丸基底部融合，在该处以 4～10 个为一组形成睾丸网，睾丸网构成细的管道网络引流入输出管。再进入男性的主要附属生殖器官附睾头。这些输出管道在精子的储存及成熟过程中起作用 。

在缺乏男性决定因子时，原始性腺的皮质部分发展为卵巢。被认为来自增殖的体腔上皮细胞的颗粒细胞，向生殖细胞游走并围绕，从而形成原始卵泡。在胚胎 13～14 周时，始基卵泡很明显，每一个由一个卵母细胞外围单层颗粒细胞组成。在此发育期间，亦形成了卵泡膜细胞。这些细胞同样被认为是体腔上皮增殖的产物，并且是卵巢间质主要产生激素的细胞。它们与颗粒细胞层以基底膜分隔而围绕卵泡。在妊娠 20 周时，始基卵泡达最大数量，可有 600 万～700 万。此后其数目通过称为闭锁的过程而逐渐减少，等出生时仅有 100 万～200 万始基卵泡存在。该过程与激素变化无关，在幼儿期继续减少，到青春期卵巢内还有 30 万～40 万个始基卵泡，其中，300～400 个在妇女从初潮至绝经期的这一生育年龄阶段会排卵，而其余的则闭锁。应注意原始卵泡的卵母细胞发育停止于第一次减数分裂前期，并维持于该阶段直至它或是闭锁退化或是在排卵前短期迅速再次进入减数分裂，这是很重要的。因之，一个特定卵母细胞可能停止于该发育阶段短至 12～14 年或长达 45～50 年。出生时卵巢直径约 1cm。构成卵巢主体的皮质由生殖上皮、间质及卵泡复合物组成。间质含有卵泡膜细胞、收缩细胞及结缔组织，卵泡复合物由颗粒细胞围绕卵母细胞组成。卵巢的皮质区主要是卵细胞发生及产生卵巢甾体激素，而卵巢的髓质对营养物与代谢物的流入及输出十分重要。

胚胎第 7 周，胎儿含有男、女性生殖道的始基。男性的中肾管或午非管将分化为附睾、输精管、精囊及射精管，女性的副中肾管或苗勒管

将发育为子宫、输卵管及阴道上部。向任一方向的发育均在第 3 个月末完成。如果因为发育异常缺乏性腺或性腺是卵巢，则生殖道向女性方向发育。然而，如果一侧缺乏中肾，肾发育不全通常将导致伴有的子宫输卵管发育不良或缺如。这些提示在两个管道系统发育中的相互关系，这一关系目前了解得还不够。睾丸的影响是积极的。胎儿睾丸内的特异性 Sertoli 细胞产生苗勒管抑制物质（MIS）。如其名称所包含的它抑制苗勒系统的进一步发展，因此即使在睾丸完全分化以前，男性已可通过苗勒管的萎缩而辨认，后者发生于胚胎 43～50 天。这种抑制作用不能通过给雄激素即使是大剂量的雄激素产生。MIS 的基因现已克隆化，已可得到该糖蛋白物质以供进一步研究。刺激午非管并分化为附睾、输精管及精囊，需要有胎儿睾丸分泌的睾酮及这些器官中雄激素受体的存在。与睾丸在男性生殖道形态发育方面起积极作用的男性系统相比，女性系统的发育为被动性的。缺乏雄激素及 MIS 时，副中肾（苗勒）管正常发育为输卵管、子宫、宫颈及阴道上部而中肾（午非）管退化。

在第 8 周以前，两性的外生殖器相同。到第 8 周时他们仍有能力向男性或女性方向分化。未分化的生殖器含有阴唇、阴囊皱襞，位于泌尿生殖沟两侧的尿道旁皱襞的外侧。在女性中，尿道旁皱襞保持分开而变为小阴唇，男性中他们融合而形成尿道海绵体包括了男性尿道。女性中阴唇、阴囊皱襞保持分离形成大阴唇。在男性中它们在中线融合形成阴囊。至 12～14 周，尿道旁皱襞亦融合形成男性尿道及尿道海绵体。在该时期，男、女性胎儿可以通过外生殖器检查而区别。与生殖道分化类似，女性外生殖器的分化发生于缺乏雄性激素的条件下。相比来说，向男性外生殖器方向的分化，仅发生于能分泌睾酮的睾丸存在时。睾酮本身负责生殖道的发育，而男性外生殖器取决于双氢睾酮。泌尿生殖窦及生殖结节的发育需要 5a－还原酶，甚至在睾丸发育具有合成睾酮的能力以前，该酶使睾酮转变为双氢睾酮。

在发育中任何时点，上述过程均可能发生不足。睾丸不能产生足量的睾酮，引起内生殖器发育的失败。男性中，由于遗传性缺陷，发育的内生殖器缺乏受体，导致这些器官对睾酮不能起反应。此外，睾丸Sertoli 细胞产生的 MIS 引起苗勒管完全退化，因而这些个体无输卵管、子宫、

宫颈或阴道上部。其净效应是内生殖器完全缺如而外生殖器发育为女性方向，该情况即为睾丸女性化。出生后睾丸保留于腹腔内并继续分泌发育年龄的适量睾酮，然而在青春期即发生女性化。在受体缺如的情况下，睾酮不能作用于靶器官。并且，雌激素也由睾丸正常产生，并通过睾酮的性腺外转化。苗勒氏系统不能融合可造成内生殖器官的多种先天异常。这些异常的范围可以从子宫、宫颈的完全复制至单侧缺乏时的一个宫角缺如。胎儿的此类先天异常能对将来的生殖功能有显著影响。

从胚胎发育的简述中，可见男、女性腺均有双重功能：他们产生能决定及维持个体性特征的激素，并且他们提供生殖细胞构成产生下一代新个体的生物学基础。

我们将见到成人性腺的很多成分能产生甾体激素，包括睾丸的 Leydig 细胞、卵巢的卵泡膜细胞与颗粒细胞及黄体的黄体细胞。它们产生的三种主要激素有雌激素、孕激素与雄激素将深入讨论。

从初潮开始，随着一个完整并精细调控的下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴，卵巢开始有周期性的功能，卵巢的卵泡膜细胞与颗粒细胞开始产生雌激素、孕激素及雄激素。在每个月经周期中，数个卵泡被募集，并对促性腺激素起反应而进一步发育。颗粒细胞成倍增加并且在卵泡内液体积聚。充满液体的腔称为窦腔。通常选出一个完全成熟的卵泡排卵。当卵泡液进一步积聚，大量复制的卵泡细胞被推向边缘。卵母细胞由液体及一些颗粒细胞所包围，并以颗粒细胞形成细颈悬于卵泡边缘。该结构被称为 Graafian 卵泡，根据 1672 年荷兰医生 De Graaf 首次描述而命名。随 Graafian 卵泡体积增大，它突向卵巢表面，形成可见的突起。在一定时间卵泡包囊变薄，卵泡破裂释放卵母细胞。发生卵母细胞释放的确切机制，虽经大量研究，但目前尚未充分了解，但很多相互有关的形态学与生化过程已被确定。

一旦原始卵泡被募集并开始成熟变化，围绕卵母细胞的单层颗粒细胞则从鳞形变为方形。卵母细胞大小增加并且有透明带包裹，透明带是由颗粒细胞分泌的一种无细胞结构的糖蛋白基质构成。此时为初级卵泡。继之颗粒细胞迅速进行有丝增殖，从初级卵泡转变为次级卵泡。纺锤形间质细胞与颗粒细胞的基底膜接近成为卵泡膜细胞，最靠近基底膜

的称为卵泡内膜细胞。这两类细胞的疏松排列为他们之间密切的激素相互作用创造条件。

如上所述，在一定时间内颗粒细胞含有丰富的LH受体，从而能对排卵前LH峰起反应。LH的释放引起颗粒细胞分化为黄体细胞。卵泡排卵后形成黄体，毛细血管与结缔组织穿透基底膜板并渗入黄素化颗粒细胞中。成熟黄体由那些大而扁、染色浅的黄体细胞巢组成，它被结缔组织的血管隔所分离。在黄体的边缘，可见一层黄素化卵泡膜细胞。

7. 环境因素

环境中多种因素对生殖健康存在影响，气象因素、外界辐射、化学污染物质、药物、不良生活方式等均可以导致生育能力下降、不孕不育、流产、早产、胎儿生长受限、先天畸形及子代性别比例失调等。一些化学物质在环境中降解缓慢，通过食物链富集于人体，影响激素的产生、释放、转运、分解、清除，改变体内激素水平并（或）与激素受体结合，产生类似雌激素或抗雄激素作用，被称为环境雌激素。环境中铅、镉、汞等重金属，氯化物、苯等有机溶剂及一些药物均有环境雌激素的作用。环境雌激素对雄性生殖系统的影响表现为：性腺发育不良，生精细胞、支持细胞、间质细胞数目减少，精液质量下降，精子数目减少等。铅通过气血屏障进入睾丸组织，损伤曲细精管的各级生精细胞和支持细胞，使精子生成减少，活力下降，能量代谢减少，染色体畸变，精子畸形率增高。环境雌激素可以引起卵母细胞染色体畸变、影响受精卵的发育和着床、干扰胚胎发育关键性基因的表达，导致胚胎发育及分化异常，使子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征等发病率增加。铅暴露下的雌鼠体内雌二醇代谢酶活性降低，雌激素水平改变。

尽管具有各异的形态和功能，但泌尿系统与生殖系统在胚胎发育上却具有密切的联系。两者的主要器官，即肾和生殖腺均起源于中胚层。在发育过程中，两者的细胞都发生了不同程度的迁移，也即最终形成的器官位置已经不同于原始发生细胞的起源位置，这一过程充分体现了泌尿生殖系统的发育过程是一个动态变化的过程。

（李 伟 王 卉）

参考文献

[1] Sanz AB, Sanchez - Niño MD, Martín - Cleary C, et al. Progress in the development of animal models of acute kidney injury and its impact on drug discovery. Expert Opin Drug Discov, 2013, 8 (7): 879 - 895

[2] Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11 (1): 37 - 49

[3] Seppo Vainio , Yanfeng Lin. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. Nature Reviews Genetics, 2002, 3 (7): 533 - 543

[4] Barrionuevo FJ, Burgos M, Scherer G, et al. Genes promoting and disturbing testis development. Histol Histopathol, 2012, 27 (11): 1361 - 1383

[5] Larson A, Nokoff NJ, Travers S. Disorders of sex development: clinically relevant genes involved in gonadal differentiation. Discov Med, 2012, 14 (78): 301 - 309

[6] Rivera MN, Haber DA. Wilms´tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. Nat Rev Cancer, 2005; 5 (9): 699 - 712

[7] William J. Larsen Human Embryology, 3th ed. People's Medical Publishing House, 2002

专题 12

非对称性发育

——消化系统和呼吸系统的发育

消化系统包括消化管和消化腺两部分。众所周知，与四肢、泌尿、生殖等器官系统发生的对称性不同，消化系统的发生具有典型的发育不对称性。比如，肝脏位于腹上部的右侧，而胃和胰腺位于腹上部的左侧；小肠和大肠大腹腔中亦呈现不对称性状态。消化系统和呼吸系统的大多数器官由原始消化管分化而成。

人胚第 3 ~ 4 周，胚盘向腹侧卷折，形成圆柱状胚体，内胚层被卷入胚体内，形成一条头尾方向的封闭管道，称原始消化管或原肠（primitive gut）。原始消化管头、尾两端分别由口咽膜和泄殖腔膜封闭，两者分别于第 4 周和第 8 周破裂、消失，原始消化管遂与外界相通。原始消化管头段称前肠（foregut），主要分化为部分口腔底、舌、咽、食管、胃、十二指肠上段、肝、胆囊、下颌下腺、舌下腺、胰腺、喉及其以下的呼吸管道、肺、胸腺、甲状腺及甲状旁腺等器官；中段称中肠（midgut），其腹侧与卵黄囊相通，主要分化为十二指肠中下段、空肠、回肠、盲肠、升结肠和横结肠的右 2/3 段；尾段称后肠（hindgut），主要分化为横结肠左 1/3 段、降结肠、乙状结肠、直肠和肛管上段以及膀胱和尿道的大部分（图 16）。

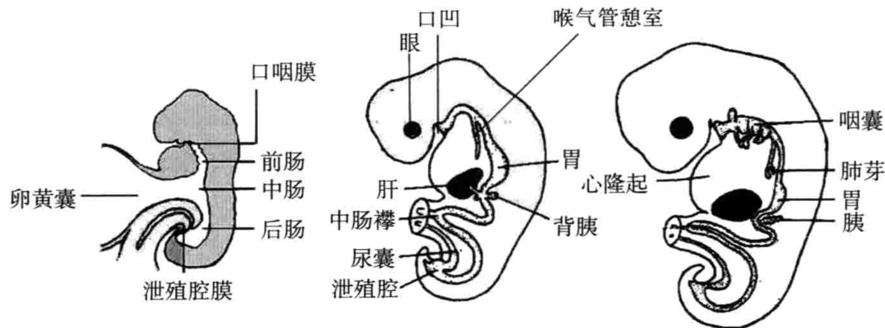


图 16　原始消化管的早期演变

消化系统和呼吸系统各器官中的上皮组织来自原始消化管的内胚层，结缔组织和肌组织则来自脏壁中胚层。

消化系统的发育

1. 前肠的衍化

从口咽膜至肝原基发生处的一段原肠称为前肠。前肠将衍化成许多器官，本节主要讨论咽囊的演变及舌、食管、胃、肝、胆囊和胰腺的发生。

（1）咽囊的演变　前肠头端膨大的部分称原始咽（primary pharynx），呈左右宽、腹背窄、头端宽、尾端窄的扁漏斗形。原始咽侧壁向外膨出，形成5对囊状突起，称咽囊（pharyngeal pouch）。随着胚胎发育，咽囊将演变为一些重要器官（图 17）。

①第 1 对咽囊：外侧份膨大，形成中耳鼓室，其外侧的鳃膜形成鼓膜，第 1 鳃沟形成外耳道。内侧份伸长，形成咽鼓管。

②第 2 对咽囊：外侧份退化；内侧份残留的浅窝演化为腭扁桃体窝，其内胚层分化为扁桃体表面上皮。

③第 3 对咽囊：腹侧份上皮细胞增生，形成一对向尾侧生长的细胞

索，其尾段在胸骨背侧合并，形成胸腺。背侧份上皮细胞增生并随胸腺下移至甲状腺背侧，形成下一对甲状旁腺。

④第 4 对咽囊：腹侧份退化；背侧份上皮细胞增生并迁移至甲状腺背侧，形成上一对甲状旁腺。

⑤第 5 对咽囊：形成一小的细胞团，称后鳃体（ultimobranchial body）。一般认为，后鳃体的细胞迁入甲状腺，分化为滤泡旁细胞。也有人认为，滤泡旁细胞由迁移来的神经嵴细胞分化而成。

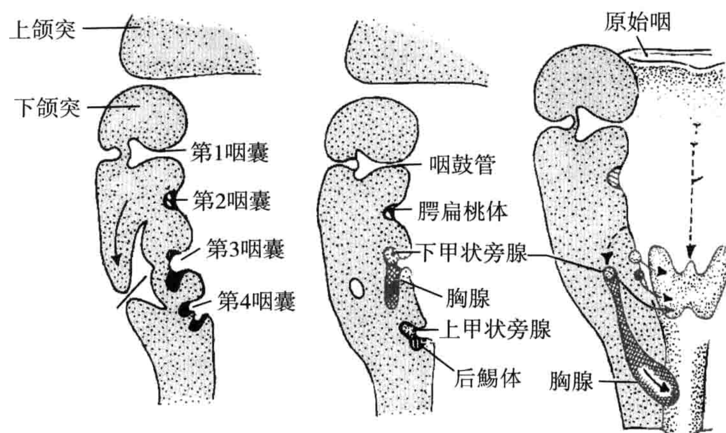


图 17　咽囊的演变

（2）舌的发生　第 4 周末，咽底中央第 1 对鳃弓腹内侧间充质增生，形成一个较小的突起，称奇结节（tuberculum impar）。在奇结节前方两侧，即左、右下颌突的内侧面间充质增生，各形成一个较大的突起，称侧舌膨大（lateral lingual swelling）。

两个侧舌膨大迅速生长，越过奇结节并在中线融合，形成舌的前 2/3，即舌体。奇结节仅形成盲孔前舌体的一小部分或退化消失。与此同时，在奇结节的背侧，第 2、第 3、第 4 对鳃弓腹内侧间充质增生，凸向咽腔，形成另外两个突起，腹侧的一个称联合突（copula），背侧的一个称鳃下隆起（hypobranchial eminence）。鳃下隆起的腹侧份生长迅速，越过联合突，形成舌的后 1/3，即舌根。联合突被埋于深部并逐

渐退化消失。舌体与舌根的愈合处留有一“V”形沟，称界沟（terminal sulcus），“V”形沟顶有一浅窝，称盲孔（foramen cecum），是甲状舌管（thyroglossal duct）的起始端（图 18）。

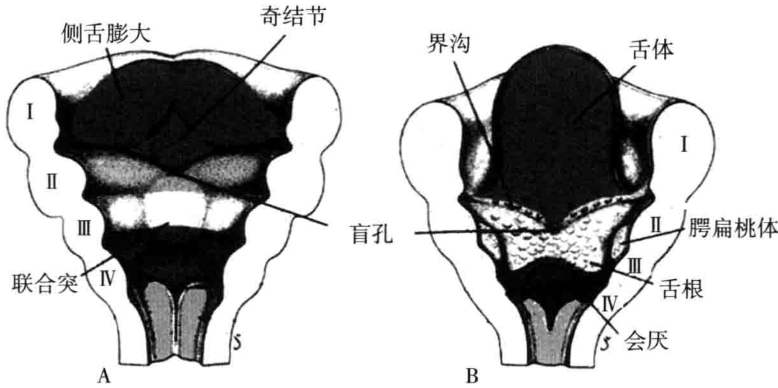


图 18　舌的发生

（3）食管和胃的发生　食管由原始咽尾端至胃之间的一段原始消化管分化而来，第 5 周时还很短，随着颈的出现和心、肺的下降而迅速增长。食管上皮最初为单层，后变为复层。上皮周围的间充质分化为食管壁的结缔组织和肌组织。

胃原基出现于第 4 周，是前肠尾段形成的梭形膨大。第 5 周时，其背侧缘生长迅速，形成胃大弯（greater curvature）；腹侧缘生长缓慢，形成胃小弯（lesser curvature）。以后，胃大弯头端向上膨出，形成胃底。由于胃背系膜（dorsal mesogastrium）生长迅速，形成突向左侧的网膜囊，致使胃沿头尾轴旋转 90°，胃大弯由背侧转向左侧，胃小弯由腹侧转向右侧。此时，因肝的增大使胃的头端被推向左侧，胃的尾端因十二指肠贴于腹后壁而被固定。这样，胃又沿其背腹（前后）轴旋转，由原来的垂直位变成由左上至右下的斜行位（图 19）。

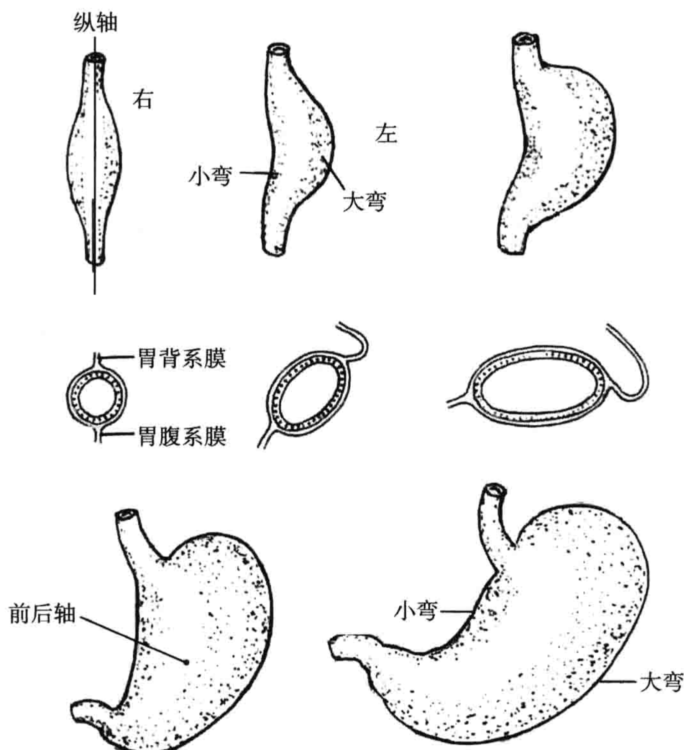


图 19　胃的发生

（4）肝和胆囊的发生　第 4 周初，前肠末端近卵黄囊处的腹侧壁内胚层上皮增生，形成一囊状突起，称肝憩室（hepatic diverticulum），是肝和胆囊的原基（primordium）。肝憩室迅速增大，长入原始横膈内，其末端膨大，分为头、尾两支（图 20）。头支（cranial limb）较大，是肝的原基。该支生长迅速，其上皮细胞增殖，形成许多分支并相互吻合成网，即肝索。肝索以后分化为肝板、界板及肝内各级胆管。大约第 6 周，肝细胞间出现胆小管，第 9～10 周出现肝小叶。第 3 个月，肝细胞开始分泌胆汁并出现其他功能。原始横膈中的间充质分化为肝内结缔组织和肝被膜。胚胎时期，肝具有造血功能，主要产生红细胞，也产生少量粒细胞和巨核细胞。第 5 个月后，肝的造血功能逐渐减弱，至出生时

基本停止，但保留有少量造血干细胞。

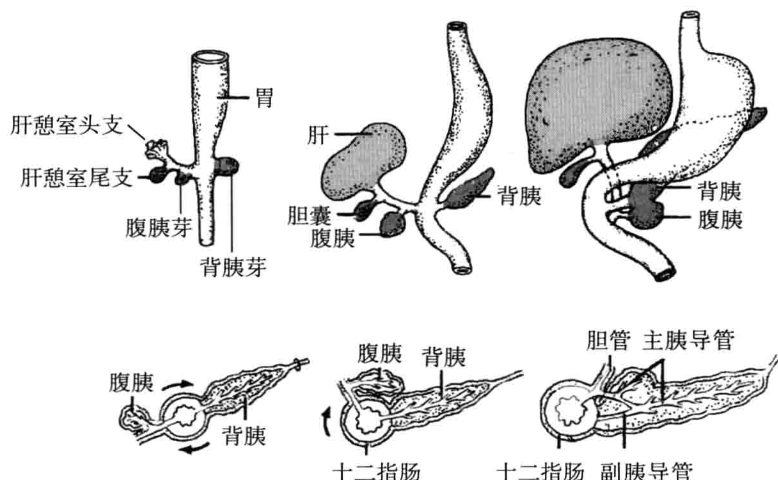


图 20 肝、胆、胰的发生

肝憩室尾支（caudal limb）较小，其近端发育为胆囊管，远端扩大，发育成胆囊，肝憩室根部则发育为胆总管。最初，胆总管开口于十二指肠的腹侧壁，后因十二指肠右侧壁发育快于左侧壁以及十二指肠的转位，胆总管的开口逐渐移至十二指肠的背内侧（图 20）。

（5）胰腺的发生　第 4 周末，前肠末端近肝憩室处，内胚层细胞增生，向背侧和腹侧突出，形成两个憩室。背侧的憩室出现早，位置稍高，称背胰芽（dorsal pancreatic bud）。腹侧的憩室出现晚，紧靠肝憩室尾缘，体积略小，称腹胰芽（ventral pancreatic bud）（图 20）。背、腹胰芽的上皮细胞增生，形成细胞索。这些细胞索反复分支，其末端形成腺泡，与腺泡相连的各级分支形成各级导管。部分细胞脱离上皮细胞索形成腺泡间的细胞团，后分化为胰岛。于是，背、腹胰芽分化成了背胰（dorsal pancreas）和腹胰（ventral pancreas），两者各有一条贯穿腺体全长的总导管，分别称背胰管（dorsal pancreatic duct）和腹胰管（ventral pancreatic duct）（图 20）。以后，由于胃和十二指肠方位的变化及肠壁的不均等生长，背胰与腹胰融合，形成一个胰腺。腹胰形成胰头

的下份，背胰形成胰头上份、胰体和胰尾。腹胰管与背胰管远侧段接通，形成主胰导管（main pancreatic duct），与胆总管汇合后，共同开口于十二指肠乳头。背胰管的近侧段大多退化消失，在少数个体形成副胰导管（accessory pancreatic duct），开口于十二指肠副乳头（图 20）。

2. **中肠的演变**

胚胎第 4 周时，中肠为一条直管，借背系膜连于腹后壁。中肠头段与前肠末端共同形成十二指肠。第 5 周，由于中肠增长速度比胚体快，致使十二指肠以下的一段中肠向腹侧弯曲，形成一矢状位的“U”形肠襻，称中肠襻（midgut loop）。中肠襻顶部与卵黄蒂相连，并以此为界分为头、尾两支。肠系膜上动脉（superior mesenteric artery）走行于中肠襻背系膜的中轴部位（图 16，21A）。

第 6 周，中肠襻生长迅速，由于肝和肾的增大，腹腔容积相对变小，迫使中肠襻突入脐带中的胚外体腔即脐腔（umbilical coelom）内，形成生理性脐疝（physiological umbilical hernia）（图 21B）。中肠襻在脐腔内不断增长，同时以肠系膜上动脉为轴，逆时针方向（由胚胎腹侧观）旋转 90°，致使中肠襻由矢状位转为水平位，头支转至右侧，尾支转至左侧（图 21B）。此时，尾支上出现一囊状突起，称盲肠突（caecal bud），是盲肠和阑尾的原基。

第 10 周时，腹腔容积增大，中肠襻从脐腔退回腹腔，脐腔随之闭锁。中肠襻在退回腹腔时，头支在前，尾支在后，同时逆时针方向再旋转 180°，使头支转至左侧，尾支转至右侧（图 21C）。在此过程中，中肠襻继续发育，头支形成空肠和回肠的大部分，退回腹腔后，位居腹腔中部；尾支形成回肠末端和横结肠的右 2/3。盲肠突近段形成盲肠，远段形成阑尾。最初，盲肠和阑尾位置较高，位于肝右叶下方（图 21D），后来降至右髂窝，在此过程中，升结肠形成。

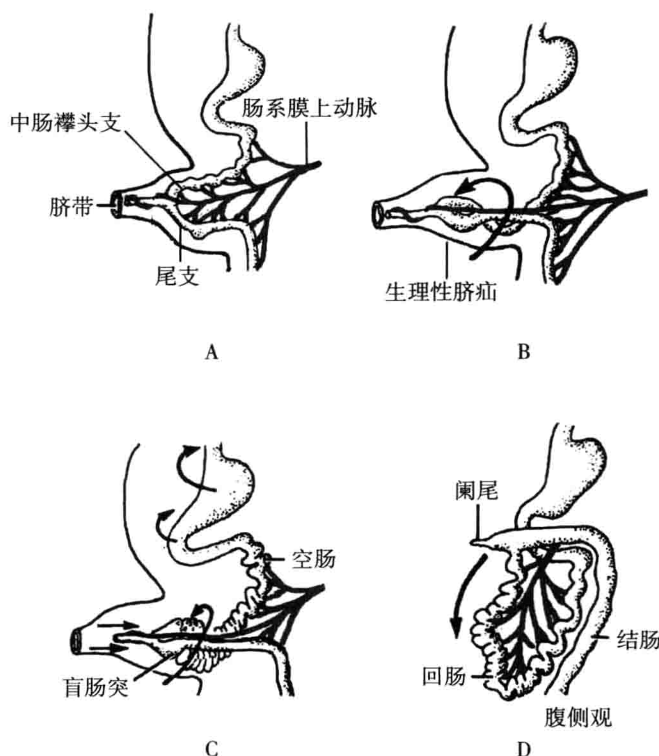


图 21　中肠襻的旋转（侧面观）

3．**后肠的演变**

当中肠襻退回到腹腔时，后肠的大部被推向左侧，形成横结肠的左1/3、降结肠和乙状结肠（图 21D）。后肠的末段膨大，称泄殖腔（cloaca），其腹侧与尿囊相连，末端以泄殖腔膜（cloacal membrane）封闭（图 21）。第 6～7 周，尿囊与后肠之间的间充质增生，形成一突入泄殖腔的镰状隔膜，称尿直肠隔（urorectal septum）。当尿直肠隔与泄殖腔膜接触后，泄殖腔即被分为腹、背两份。腹侧份称尿生殖窦（urogenital sinus），主要发育为膀胱和尿道。背侧份称肛直肠管（anorectal canal），发育为直肠和肛管上段。泄殖腔膜被分为腹侧的尿生殖膜（urogenital membrane）和背侧的肛膜（anal membrane），尿直肠隔的尾端形成会阴体（图 22）。肛膜外方为一浅凹，称肛凹（anal pit）（图 22）。第 8 周末，肛膜破裂，肛凹加深，演变为肛管下段。肛管上段上皮来自内胚层，下段上皮来自外胚层，两者的分界线为齿状线（pectinate line）。



图 22 泄殖腔的分隔

4. 消化系统的常见畸形

(1) 消化管狭窄、闭锁和重复畸形　在消化管发生过程中，上皮细胞曾一度过度增生，致使管腔暂时闭塞。以后，过度增生的细胞凋亡 (apoptosis)，使管腔重新出现。若管腔重建 (recanalization) 过程受阻，致使某一段消化管管腔过细，称为消化管狭窄 (stenosis)；若完全无管腔，则称为消化管闭锁 (atresia)，这两种畸形常见于食管和十二指肠。若管腔内留有一纵行隔膜，将某一段消化管分为并列的两份，则称为消化管重复畸形 (duplication)，多见于回肠。

(2) 先天性脐疝　胎儿出生时，肠管从脐部膨出，称先天性脐疝 (congenital umbilical hernia)，是因肠襻未从脐腔退回腹腔或肠襻虽退回腹腔，但脐腔未闭锁所致 (图 23A)。

(3) 卵黄管异常　胚胎第 6 周，卵黄管闭锁并逐渐退化消失。若卵黄管未闭锁，回肠与脐之间残留一瘘管，出生后，肠内容物可通过该瘘管从脐溢出，这种异常称脐瘘 (umbilical fistula) 或卵黄蒂瘘 (vitelline fistula) (图 23B)。若卵黄管远段闭锁，但基部保留一段盲囊连于回肠，则称为梅克尔憩室 (Meckel's diverticulum)，其顶端可有纤维索 (卵黄蒂韧带) 与脐相连 (图 23C)。



图 23 肠管的先天性畸形

（4）中肠襻旋转异常　中肠襻从脐腔退回腹腔时，应逆时针方向旋转 180°。如果未发生旋转、转位不全或反向转位，就会形成各种各样的消化管异位，并常伴有肝、脾、心、肺的异位。

（5）先天性无神经节性巨结肠　由于神经嵴细胞未能迁移至结肠壁，使该段肠壁缺少副交感神经节细胞，因而肠管不能蠕动，致使近端结肠内粪便淤积，造成肠壁极度扩张，称为先天性无神经节性巨结肠（congenital aganglionical megacolon）。该畸形多见于乙状结肠。

（6）肛门闭锁　肛管与外界不通称肛门闭锁（imperforate anus），可因肛膜未破或肛凹与直肠末端未能相通所致。这种畸形常伴有直肠膀胱瘘（rectovesical fistula）、直肠尿道瘘（rectourethral fistula）及直肠阴道瘘（rectovaginal fistula）（图 24）。

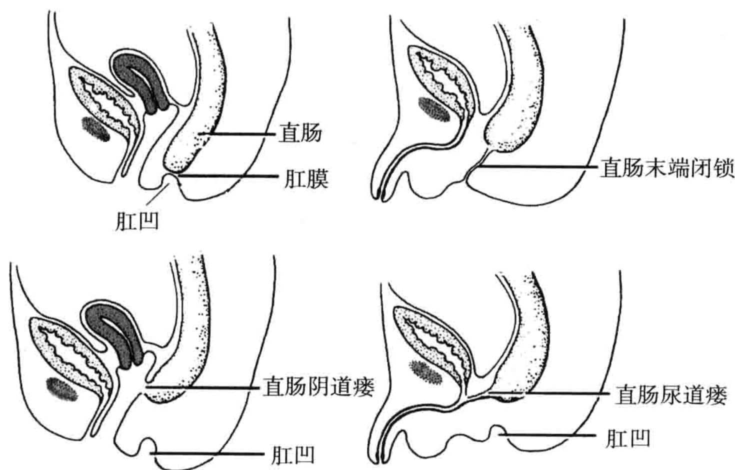


图 24　肛门闭锁

（7）环状胰　腹胰芽有时分为左、右两叶。如果两个叶分别沿相反方向绕十二指肠与背胰融合，则形成一个环绕十二指肠的胰腺，称环状胰（annular pancreas）（图 25）。环状胰大多无症状，但有时会压迫十二指肠和胆总管，甚至造成十二指肠梗阻。

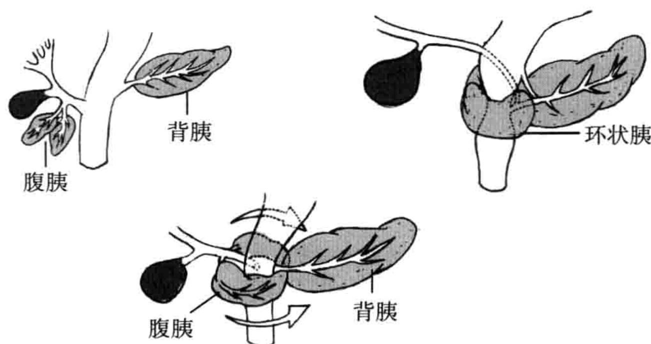


图 25 环状胰

呼吸系统的发育

1. 喉、气管和肺的发生

第 4 周初，原始咽尾端腹侧壁正中出现一纵行浅沟，称喉气管沟（laryngotracheal groove）（图 26）。喉 气管沟逐渐加深，在食管的腹侧形成一盲囊，称喉气管憩室（laryngotracheal diverticulum）（图 16，26），是喉、气管的原基。喉气管憩室与食管间的间充质隔称气管食管隔（tracheoesophageal septum）（图 26）。

第 4 周末，喉气管憩室末端膨大并分为左、右两支，称肺芽（lung bud），是支气管和肺的原基。肺芽反复分支，形成肺内支气管树。第 6 个月末，支气管分支已达 17 级，出现终末细支气管、呼吸性细支气管和少量肺泡。第 7 个月，肺泡数量增多，肺泡上皮除 I 型细胞外，还出现了 Ⅱ 型细胞，并分泌表面活性物质（surfactant），肺泡隔内毛细血管也很丰富，因而 7 个月的早产儿已可存活。出生前数周，肺经历一个快速成熟阶段。这时肺泡增大、肺泡壁变薄，肺泡腔内液体逐渐被吸收，Ⅱ 型肺泡细胞增多，表面活性物质的分泌量增加。出生后直至幼儿期，肺仍继续发育，肺泡数量继续增多。

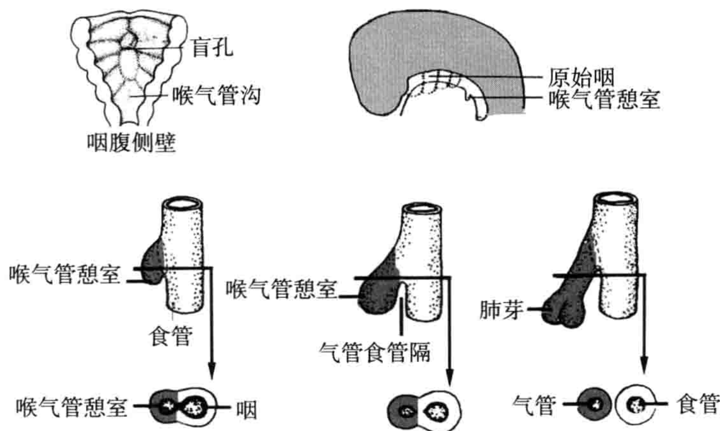


图 26　喉气管憩室的发生和演化

2. 呼吸系统的常见畸形

(1) 喉气管狭窄或闭锁　喉和气管在发生过程中曾因上皮过度增生而使管腔闭塞，然后过度增生的上皮细胞凋亡，管腔随之重现。如果其管腔重建过程受阻，就会出现喉、气管狭窄或闭锁（stenosis or atresia of larynx and trachea）。

(2) 气管食管瘘　如果气管食管隔发育不良，就会使气管与食管分隔不完全，两者间有瘘管相连，称气管食管瘘（tracheoesophageal fistula），常伴有食管闭锁（esophageal atresia）（图 27）。

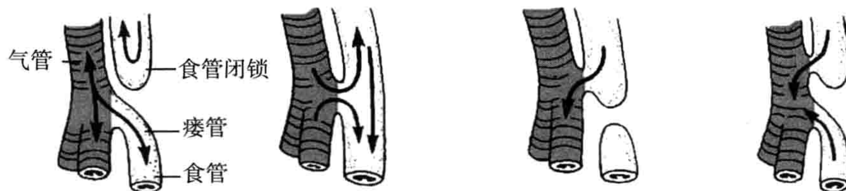


图 27　气管食管瘘

(3) 透明膜病　该病多见于孕 28 周前的早产儿。由于肺泡Ⅱ型细胞分化不良，不能产生足够的表面活性物质，致使肺泡表面张力增大。胎儿出生后，因肺泡不能随呼吸运动扩张而出现呼吸困难。显微镜检查显示肺泡塌陷，间质水肿，肺泡上皮表面覆盖一层透明状血浆蛋白膜，

故称透明膜病（hyaline membrane disease）。

（吴智群　张远强）

参考文献

[1] 张远强. 发育生物学. 北京：人民卫生出版社，2007
[2] 高英茂. 组织学与胚胎学. 北京：高等教育出版社，2010
[3] 成令忠，钟翠平，蔡文琴. 现代组织学. 上海：上海科学技术文献出版社，2003
[4] 刘厚奇，蔡文琴. 医学发育生物学. 3 版. 北京：科学出版社，2012
[5] 唐军民，李继承. 组织学与胚胎学. 北京：北京大学医学出版社，2011
[6] Gilbert SF. Developmental biology. 7th ed. Washington：Sinauer Associates Inc，2003
[7] Ebent EC. Human intestinal intraepithelial lymphocytes keep TNFalpha levels low by cell uptake and feedback inhibition of transcription. Cell Immunol，2006，241：7 - 13
[8] Ishikawa T. Characterization of in vitro gut - like organ formed from mouse embryonic stem cells. Am J Physiol Cell Physiol，2004，286：C1344 - 1352
[9] Kim JH. Novel mutations of RET gene in Korean patients with sporadic Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg，2006，41：1250 - 1254
[10] Torihashi S. Formation of gut - like structures in vitro from mouse embryonic stem cells. Methods Mol Biol，2006，330：279 - 285

专题 13

殊途同归

——心血管系统的发育

循环系统的发现和种属间差异

1. 发现史

循环系统是由生物体的细胞外液（包括血浆、淋巴和组织液）及其借以循环流动的管道组成的系统。从动物形成心脏以后循环系统可分为心脏和血管两大部分，统称心血管系统。循环系统是生物体内的运输系统，它将消化道吸收的营养物质和由鳃或肺吸进的氧气输送到各组织器官，并将各组织器官的代谢产物通过同样的方式输入血液，经肺、腮及肾排出。它还能输送热量到身体各部以保持体温，并将激素等信息物质输送到靶器官以调节其功能。现在，人们对这种概念习以为常。和其他学科发展史一样，在循环系统发现和研究的历史上，曾出现过很多伟大的神学家、博物学家、动物学家和生理学家等，也经历了多次破折和反复，最终才有了今天广泛承认的结果。

对于循环系统的研究可以追溯到古希腊时期的亚里士多德（Aris-

totle，公元前384—322）和古罗马时期的盖伦（Galen，129—199），他们曾亲自做过大量的解剖，也对心脏和血管进行过细心的研究，但是却从未想到血液会循环流动。意大利的达·芬奇（Da Vinci，1452—1519）在研究循环系统的时候曾想到，血管的硬化是老年人死亡的重要原因之一。直到现代生理学奠基者，英国著名的生理学家哈维（Harvey，1578—1657，图28）于1628年发表《动物心血运动解剖论》之后，仍有许多内科医生们不愿接受哈维的观点，即人体内的血液不停地通过一个闭合的血管体系循环，使血液流动的力量来自于心脏。事实上，哈维是通过一个简单的数学运算形成血液循环这一概念的。哈维估计心脏每次跳动的排血量大约是2盎司（1盎司约28克），由于心脏每分钟跳动72次，所以用简单的乘法运算就可以得出结论：每小时大约有540磅血液从心脏排入主动脉。但是540磅（1磅约0.45千克）远远超过了一个正常人的体重，更加远远地超过了血液本身的重量。因此，哈维意识到很可能是等量的血液往复不停地通过心脏。提出这一假说后，他花费了9年时间来做实验和仔细观察，掌握了血液循环的基本情况。虽然由于没有显微镜，哈维无法直接看到连接动脉和静脉的毛细血管来证实他的推测，但是他却正确地推断出了毛细血管的存在（哈维去世几年以后，意大利生物学家发现了毛细血管）。



图28　哈维

2. 种属间差异

单细胞的原生动物，如变形虫和草履虫，细胞表面直接与外环境（水）接触，从水中摄取食物和氧气，向水中排出代谢的废物，因此物质进、出细胞主要靠扩散。海绵动物没有循环系统但有水管系统。海绵动物的海绵腔内壁上有许多漏斗细胞，这种细胞上的鞭毛一齐摆动，驱使海绵周围的水经由孔细胞的小孔进入海绵腔，从出水口排出。海绵从水流中获得食物和氧气，向水流排出代谢废物。腔肠动物也没有循环系统，但有胃水管系统。胃水管系统有消化并兼具运输功能。多细胞动物

发展到更高的阶段才出现由专用管道输送体液的循环系统，依据循环系统的结构，又分为开放式循环系统和封闭式循环系统。

（1）开放式循环系统　无脊椎动物中的绝大多数节肢动物、许多软体动物以及海鞘类。例如在节肢动物，心脏搏动把血液经过动脉送到器官之间的空隙内，再沿着细胞之间的空隙进入各个器官，最后经过心脏壁上的开口（心门）回到心脏。节肢动物的开放系统没有毛细血管，也没有静脉，即血液由心脏泵出，经过动脉进入开放的体液腔（血腔），而血腔实际上是内脏器官之间的空隙，各个细胞也就浸浴于血液之中。

（2）密闭式循环系统　脊椎动物、某些环节动物、软体动物的头足类和某些棘皮动物等具有封闭式循环系统，也就是说，具有一套连续的血管系统，包括心脏、动脉、毛细血管和静脉，血液在这套管道中循环。由于心血管系统形成了完整的管道，而且血管壁弹性大，因此血压较高，血液全身器官的分配以及血流速度的快慢可以调节，加之具备了微循环，无论是营养和代谢废物的运送，还是血液与细胞之间的物质、能量和信息交换，效率都大大提高，这是高级形式的循环系统。在血液循环行使功能的同时，少量组织液进入另一套封闭的管道系统，形成淋巴液，经小淋巴管逐步汇成大淋巴管，再经左侧的胸导管和右侧的大淋巴管分别进入颈内静脉和锁骨下静脉，形成淋巴循环。因为淋巴循环收集的是组织液，可以及时发现体内各处的抗原物质，因此使得淋巴系统成为人体免疫系统的重要组成部分。总的看来，体液循环由开放式到封闭式是心血管系统进化发展的一个非常重要的标志，也是不同种属间动物不断进化中的生理需求。

成人和胎儿的血循环途径比较

1. 成人血循环途径

循环系统是由心脏、各级动脉和静脉，以及将动脉和静脉连接在一起并执行物质交换功能的毛细血管组成的，此外淋巴循环还成为血循环

的辅助。在成人的循环系统里，心脏是推动血液循环的动力泵，其左心室不断地将动脉血泵入主动脉，进而由其分支的各级动脉送到人体各个器官和组织，通过其中的毛细血管与组织和细胞的代谢产物交换后自身成为静脉血，再由各级静脉收集最后汇总到右心房（一部分组织液进入毛细淋巴管并最终注入静脉），这一部分的循环叫体循环（systemic circulation）。右心房的血液进入右心室后，再进入肺动脉，当流经肺脏毛细血管时发生气体交换变成富含氧气的动脉血，再由肺静脉收集到左心房，这一部分的循环叫肺循环（pulmonary circulation）。经过体循环和肺循环，血液即完成一次循环过程。

2. **胎儿血循环特点**

胎儿的循环路径与成人有所区别，比如，从结构上看，虽然体循环和肺循环的结构基础逐步建立，但是在未出生前肺循环不会发挥功能，而途径脐带的卵黄囊循环（vitelline circulation）和脐循环（umbilical circulation）特征明显（图29）。卵黄囊循环由胚胎时期背主动脉（dorsal aorta）的分支卵黄动脉开始，经过脐带进入卵黄囊后再分支形成毛细血管，然后汇集成卵黄静脉流回右心房，以后随着卵黄囊的退化，该循环途径发生相应演变。脐循环由胚胎时期背主动脉的分支尿囊动脉演变成的脐动脉开始，经过脐带进入胎盘后，再分支成毛细血管并与母体行物质和气体交换后，将动脉血沿脐静脉送回到右心房，进而流经全身来营养胎儿，以后随着胎儿的生长发育，胎盘的血供渐渐增加，脐循环逐步壮大发达。而从生理上看，胎儿血管里流动的不是动脉血或静脉血，而是混合血，待出生后混合血才逐渐分为动脉血和静脉血，并在相应的动脉和静脉血管内各自流动。

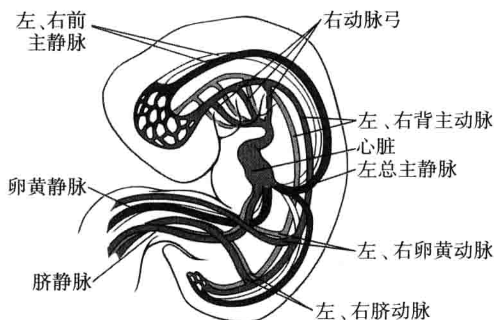


图29　四周胎儿的血循环途径

（引自：William JL. Human Embryology）

卵黄囊、血岛和生心区

1. **从禽类的卵黄到人类的卵黄囊**

鸡胚是研究动物发育的重要模型，已被大量用于发育生物学研究中。对鸡胚的研究可以追溯到古希腊著名的博物学家亚里士多德，现在对鸡胚发育的过程已有清楚的了解。当敲破一只鸡蛋的蛋壳放入碗中，能明显看到由蛋清围绕的位于中央黄色卵圆形的卵黄，其表面直径约1mm的白色斑点是鸡的卵细胞，若已经受精斑点可增大为3mm。受精的鸡蛋在合适的温度、湿度和氧气等环境下，经过约21天便可孵化出小鸡。因为卵黄富含包括中性脂肪、卵磷脂和胆固醇等在内的脂肪，同时含有丰富的作是高生物价蛋白质，钙、磷、铁等矿物质，而且含有丰富的维生素（其中以维生素A、B和D最多），而鸡又是卵生动物，其后代胚体只能在体外发育，因此鸡胚在发育过程中卵黄作为被吸收利用的营养逐渐变小，所以卵黄是鸡胚发育重要的营养来源（图30）。



图30　鸡胚及其卵黄

人胚胎发育初期会出现卵黄囊这一结构，因此卵黄囊被看作是达尔文进化论的比较胚胎学证据之一。因为人类是胎生，胚胎发育时的营养供应通过脐带来自于母体而非卵黄，因此卵黄囊出现不久就逐渐退化。但是，卵黄囊对于人类胚胎发育的重要贡献有二：一是其外表面出现的血岛，并由血岛开始衍化出胚体最早的血管和造血干细胞；二是其内部出现原始生殖细胞。在卵黄囊完全萎缩退化之前，毛细血管网络和上述的胚体循环、卵黄囊循环和脐循环等3种循环途径的雏形必须建立，原始造血干细胞和原始生殖细胞也必须迁移到胚体内的相应部位。

2. **血岛的发生与胚体循环雏形的建立**

受精卵在输卵管内形成后不断分裂、分化，当其移动到子宫腔并植

入子宫内膜时，内部的结构发生剧烈变化，最明显的是逐渐出现了上、下两个胚层构成的二胚层胚盘，以及上胚层上方的羊膜腔和下胚层下方的卵黄囊。因卵黄囊位于胚盘以外，其外表包裹着的一层结构称胚外中胚层。大约在受精后的第 3 周初，该处的胚外中胚层内间充质细胞密集成团，形成许多血岛（blood island）（图 31）。血岛周边的细胞变扁，形成毛细血管壁的内皮。血岛中央的游离细胞分化为原始血细胞（primitive blood cell），即造血干细胞。内皮管道不断向外出芽延伸，与相邻血岛形成的内皮管道互相融合通连，逐渐形成一个丛状分布的内皮管网，这就是胚胎时期最早出现的血管和血细胞雏形。其后，胚胎内部的中胚层内逐渐发生类似于卵黄囊胚外中胚层内发生的事件，形成毛细血管网，管径较粗的成为动脉和静脉的雏形，胚体循环逐步建立。在胚体循环逐步建立的同时，胚外和胚内的血管通过以后演变成脐带支持性结构的体蒂内的卵黄囊动、静脉和尿囊动、静脉相连通，不但建立了卵黄囊循环和尿囊循环，而且将造血干细胞转移到体内的胎肝等处。因此对于人类来讲，卵黄囊虽然不再是胚胎发育所需营养的主要来源，但其外表出现的血岛却是胚胎最早的血管和造血干细胞发源地，这些血管将与胚胎体内的血管相连，将造血干细胞转移到原始的胎肝和脾，进而进入骨髓等地，使得肝和脾成为胚胎时期的重要的造血器官，而红骨髓成为出生后主要的造血地。

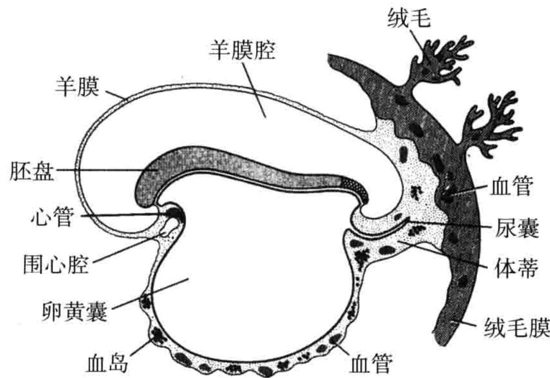


图 31　血岛

（引自：Sadler TW. Langman's Medical Embryolgy）

3. **生心区的出现**

约在受精卵形成后的第3周初，于卵黄囊外表的血岛逐渐形成和演变的同时，胚体内也发生明显的变化。此时，在上胚层一端（此端称尾端）的细胞分裂聚集，形成一条纵行的细胞条索，称原条。原条是人胚的中轴器官，其出现确立了人胚的头、尾、腹、背和左、右。紧接着，上胚层细胞从原条处向下迁移并逐渐置换了下胚层的细胞，并在上、下胚层之间留下另一层结构，该结构因位于胚盘内就叫胚内中胚层，简称中胚层。中胚层出现后，上、下胚层改称为外、内胚层。此时的胚盘由原来只由上、下胚层构成的二胚层胚盘转变成为由外、中、内胚层构成的三胚层胚盘，而三胚层胚盘正是将来发育成胎儿体内各种组织和器官的结构基础。实际上中胚层并不是一个完整的胚层，因为在胚盘的前端和后端分别有一个口咽膜和泄殖腔膜的地方没有中胚层，仍然是内、外胚层直接相贴。而将要出现心脏雏形的生心区则位于口咽膜前面的中胚层内（图32）。由此可见，生心区与血岛的发生部位分别来自于口咽膜前方的胚内中胚层和卵黄囊外表面的胚外中胚层，两者相距甚远，但它们发育的最终目标只有一个：彼此连通，并成为循环系统的重要组成部分。

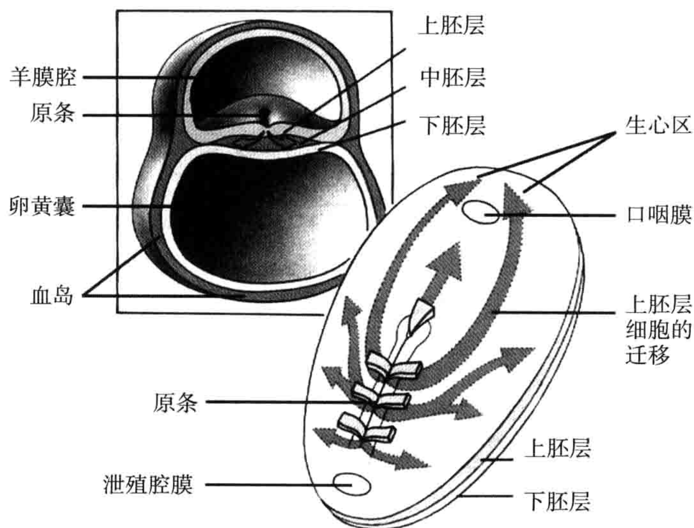


图32 生心区
（引自：William JL. Human Embryology）

心脏的形成和主要血管的演变

1. 心管的形成

约在受精卵形成后的第18天，原始体腔前端出现在生心区内，称围心腔。围心腔腹侧的中胚层细胞形成前、后纵行的左、右两条细胞索，称生心索。在周边内胚层分泌的血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor）作用下，生心索中心变空形成一对心管，并于第22天在胚盘侧褶时合并形成一个心管，该心管一端与将要演变成主动脉的血管相通，另一端与将要演变成静脉的血管相通。胚盘发生头褶后，心管由围心腔腹侧转到其背侧并逐渐移入胸腔内，围心腔改称心包腔（图33）。在以后的发育过程中，心管连同包围在心管周围由间充质细胞分化出的心胶质和心肌膜一起，形成了成人体内心壁的三层组织学结构，即心内膜、心肌膜和心外膜。

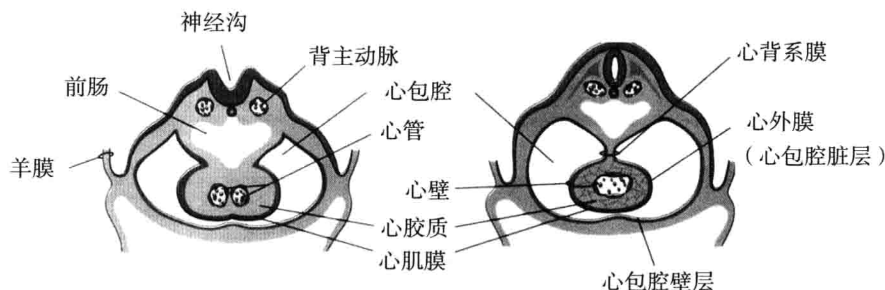


图33　心管

（引自：Moore KL. The Developing Human）

2. 心脏外形的建立

因心管各段生长速度不同，由头端向尾端依次出现心球、心室和心房3个膨大。心球通过动脉干连接动脉，心房通过末端膨大的静脉窦连接静脉，心房与心室之间的狭小通道称房室管。以后，在心房的尾端出现一个膨大称静脉窦。心球头侧较长，形成动脉干，其前方膨大形成动脉囊并由动脉囊分支处6对动脉弓。因为心球和心室生长速度快，形成

"U"形结构。其后心脏经"S"形弯曲，心房和静脉窦逐渐移行至心室后面。此时心脏的外形基本建立，但内部尚需分隔成四腔心（图 34）。

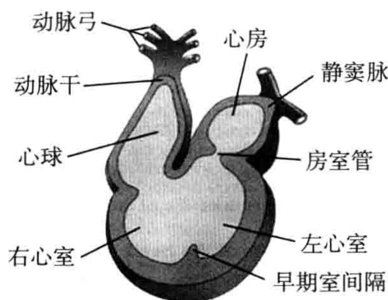


图 34 心脏外形的建立
（引自：Moore KL. The Developing Human）

3. 心脏内部的分隔及主要血管的演变

循环系统是传统概念上人体最后停止工作的系统，也是人胚各系统中最早工作的系统。在第 4 周末，心脏在外形和内部结构尚未完全形成时已经能够有节律的搏动，开始定向的功能性血液循环。将一个心管分隔成四腔心比较复杂，在心脏外形建立尚未完成之前，心脏的内部已经开始分隔。心脏内部的分隔是一个有趣的发育生物学问题。从单腔心到四腔心的演变，更是达尔文进化论中不同物种心脏结构不断进化的发育生物学标志之一。比如在脊椎动物中，鱼类为一个心房和一个心室，体内流经混合血；两栖类有两个心房一个心室，体内流经混合血；爬行类有两个心房和一个不完全分隔的心室，体内流经不完全混合血；鸟类以及哺乳类动物拥有完全分隔的两个心房和两个心室的四腔心，将动脉血和静脉血完全分隔，供氧效率大幅提高。心脏内部的分隔同样是一个复杂的胚胎学问题，在整个分隔过程中，不但要将心房和心室分隔开来，而且心房和心室也都要被分隔成左、右两部分；不但要将左、右心房分别与上、下腔静脉和肺静脉等连通，而且要将主动脉与肺动脉分别连接到左、右心室；不但要出现分隔心房和心室的瓣膜，而且要生成左心室与主动脉之间的主动脉瓣以及右心室与肺动脉之间的肺动脉瓣，这些瓣膜的生理功能是防止血液倒流。在血管的形成过程中，其管径有粗有细，分布有深有浅，逐步形成了类似于成人体内的但左右对称的一套脉管网络，成为循环系统的雏形。该雏形经历进一步的发育、演变和不对称退化，才形成成人体内的血管。

（1）房室管的分隔　房室管背侧和腹侧的心内膜下组织增生，形成背、腹心内膜垫。它们相对生长并融合，将房室管分隔并形成左、右房室孔，而其自身也参与左、右侧心房和心室间的二、三尖瓣的形成。

（2）原始心房的分隔　第 4 周末，原始心房顶部背侧壁中央出现一个半月形矢状的第一房间隔，此隔向心内膜垫方向生长，在与心内膜垫融合前，其上部出现第一房间孔。第 5 周末，第一房间隔右侧的心房顶腹侧壁出现向下生长的弓形第二房间隔，此隔逐渐封闭第一房间孔，其下部残留一个卵圆形孔，称卵圆孔。后来，第一房间隔退化，其残留的部分覆盖在卵圆孔左侧，形成卵圆孔瓣，该瓣膜只允许血液从右心房单向流入左心房，而卵圆孔是胎儿出生前肺循环未发挥功能时重要的暂时性结构之一，待胎儿出生后逐渐被封闭（图 35）。

（3）静脉窦及其相连静脉的演变　静脉窦左角萎缩，右角扩大并入右心房。肺静脉起始部分支膨大融入左心房。卵黄静脉参与肝血窦的形成，其左侧肝外段逐渐退化，右侧一端连接下腔静脉，另一端演变成门脉。脐静脉右侧退化，左侧经肝的静脉导管与下腔静脉联通。其他主要的静脉左侧基本退化，右侧继续发育。

（4）原始心室的分隔　心室壁组织向上隆起形成室间隔肌部。此结构与心内膜垫间留一孔，称室间孔。第 7 周，心球发育后封闭室间孔大部。室间孔的其余部分由心内膜垫形成的室间隔膜部封闭。

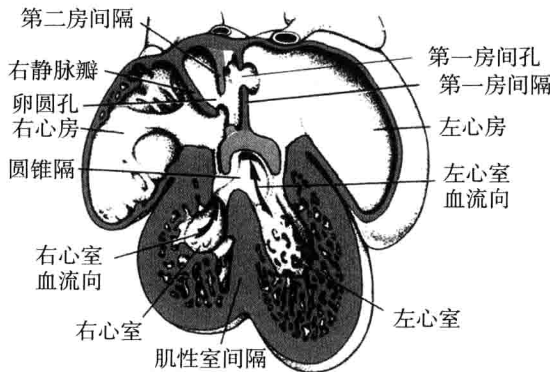


图 35　心脏内部的分隔

（引自：Sadler TW. Langman's Medical Embryology）

（5）动脉干与心球的分隔　第5周，动脉干和心球内膜下组织局部增生，形成一对延伸的螺旋状纵嵴，称左、右动脉干嵴和球嵴。左、右动脉干嵴和球嵴在中线愈合，形成螺旋状走行的主肺动脉隔，将动脉干和心球分隔成肺动脉干和升主动脉，其起始处的心内膜隆起形成心室与动脉之间的半月瓣。升主动脉连接第四对弓动脉和左心室，肺动脉干连接第六对弓动脉和右心室。

（6）六对弓动脉的演变　起始于主动脉囊，大部分退化。第三对近侧与主动脉囊形成左、右颈内动脉，远侧参与部分颈总动脉的形成。第四对左侧参与主动脉弓的形成，右侧变成右锁骨下动脉的起始部。第六对近侧形成左、右肺动脉基部，左远侧段连接左肺动脉和主动脉弓，形成动脉导管。

4. 循环系统发生中出现的畸形

畸形的发生机制是发育生物学研究的一个重要分支，各个器官在胚胎发育过程中因为自身基因或染色体畸变或者因为外界有害物质和因素的干扰，可能会出现各种各样的先天性畸形。据不完全统计，人类可识别的多发畸形有300多种。循环系统也是如此，以下列举几种常见的畸形：

（1）右位心（dextrocardia）　正常时心管向左弯曲，使心脏位于左侧。但若原始心管向右弯曲，使心脏位于胸腔的右侧，则造成右位心。大多数右位心个体呈现许多器官方位的逆转，这种情况称为内脏逆位。内脏逆位的发生率为1/7000，器官的生理功能常正常。研究提示内脏逆位是由单个蛋白缺如或功能缺陷引起的，这些蛋白对机体采用正确的手性不对称方位的能力非常重要。该假说来自对一种纯合子小鼠的研究，这种小鼠的12号染色体上发生特殊的突变，一半动物呈现大致正常的心管弯曲，而另一半动物则呈反向弯曲。这个发现指出，在胚胎发生过程中，突变小鼠的内脏器官随机地选用正位或逆位的手性。人的情况与小鼠模型相似，其心管弯曲的逆转并不总是精确的和完全的，而心腔位置的排列错误常常也导致心脏的其他畸形。

（2）室间隔缺损（ventricular septal defect）　是最常见的先天性心脏畸形，占活产婴儿心脏畸形的1/4。室间隔缺损的原因可能有上、下心内膜垫未愈合（房室隔缺损）、肌性室间隔与膜性室间隔未愈合、动

脉球嵴的近端发育不良或者发育期间肌性室间隔过度穿孔。最严重的后果是出生后由左心室向右心室有大量的血液分流，进而导致肺动脉高压。该畸形在儿童期可进行外科手术以修补缺损。

（3）房室隔缺损（atrioventricular septal defect） 又称心内膜垫缺损，是上、下心内膜垫未能愈合引起的畸形。这种畸形是 Down 综合征（即 21 三体，第 21 号染色体不是一对而是 3 条）最常见的心脏畸形之一。上、下心内膜垫未能愈合可引起多种继发性异常，如第一隔或室间隔的不完全闭合、房室瓣的异常等。其引起的一个生理变化是出生后由左心房向右心房有血液分流，分流的程度决定于缺损的严重程度。如果缺损严重，在婴儿期即可发生充血性心力衰竭。但如果仅是第一房间孔未闭合，则可以没有症状，有可能进行外科手术纠正。

（4）法洛四联症（tetralogy of Fallot） 临床症状包含肺动脉狭窄、主动脉骑跨、室间隔缺损、右心室肥大等。此种畸形的主要原因是分隔主动脉和肺动脉的螺旋形隔偏位，造成肺动脉狭窄和室间隔膜部缺损，粗大的主动脉骑跨在缺损部位，肺动脉狭窄使右心室射血阻力增加，从而引起右心室代偿性肥大（图 36）。

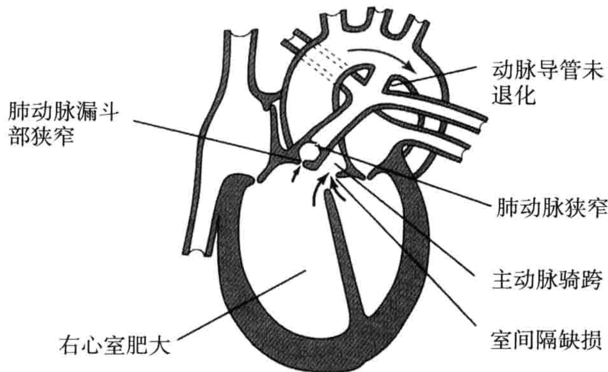


图 36 法洛四联症

5. **循环系统发生的调控**

心脏发育的调控研究刚刚起步，这涉及原肠胚时期生心中胚层的形成、发育中心脏的区域性分化、卷折和分隔等形态发生以及细胞和分子调节过程。由于人类标本得之不易，大部分有关心脏早期形态发生的主

要资料来自鸡胚或小鼠胚胎。虽然与人类心脏发育有差异，但这些资料为研究人类心脏畸形的机制提供了一定的提示和帮助。目前了解比较清楚的几个基本机制如下：

心房肌球蛋白重链（AMHC1）选择性表达于鸡胚心脏的心房细胞内。原位杂交技术显示，编码这种蛋白的 mRNA 仅见于心管的尾端，说明早在心脏刚分化时就发生 AMHC1 表达的局限化。随着原始心腔的形成，AMHC1 的表达局限于原始心房。相反，另一种肌球蛋白重链 VMHC1（心室肌球蛋白重链）表达于分化中生心区中胚层的所有细胞，但最终局限于发育中的心室。

主动脉肺动脉隔的关键成分来自未来脑脊髓特定区域的神经嵴细胞。细胞追踪实验和近年的鹌鹑-鸡嵌合系统都显示，这些心神经嵴细胞分化为外胚层间充质细胞经第 3、第 4、第 6 对鳃弓迁移进入动脉球嵴。除了形成主动脉肺动脉隔的结缔组织和平滑肌以外，这些细胞还形成心的副交感节后神经元。如果在开始迁移之前切除实验动物的心神经嵴，主动脉肺动脉隔完全不能形成，血液通过一个永存的动脉干流出左、右心室。心神经嵴发育不良或被部分或完全切除还可能引起其他异常，包括右位主动脉、三尖瓣狭窄、右第 4 弓动脉发育不良、动脉球嵴缺如或与发育不良相关联的室间隔缺损和法洛四联症。

循环系统的生后发育

1. 一般规律

胎儿出生后，经过婴儿期、儿童期、少年期、青春期、成年期和老年期等各个阶段，身体各个器官同样也经历了生长、发育、成熟、衰老直至死亡等过程。比如，骨骼和牙齿的生长发育在儿童期最快，神经系统特别是大脑的体积在青春期达到最高峰，而心智健全在 25 岁左右以后才能达到。《论语》中有：二十弱冠，三十而立，四十不惑，五十知天命，这也是对人体生长、发育的社会学诠释。对于循环系统（图 37）而言，心脏发育有两次较快阶段，即2.5岁以前和青春期性成熟时。新

生儿心脏的容积仅 20 ~ 25ml，2.5 岁时增大至 60ml，7 岁为 100 ~ 120ml，以后增长相对缓慢。至青春期又迅速增长，14 岁时达 130 ~ 150ml。人体在衰老时，心脏萎缩，重量减轻，各瓣膜出现增厚变硬。心脏的潜在力量 70 岁时只相当于 40 岁时的一半。心脏功能衰减，出现气促而短、劳则加重、血液供应不足，日久出现心脉瘀阻和心胸憋闷等症状。与此同时，全身的血管特别是动脉血管，都会逐渐硬化。血管硬化的程度和顺序在全身是不一致的，硬化的机制尚未完全清楚，但动脉血压高，在长时间使用和劳损后，管壁的损伤不能及时修复，而且管壁和管腔内沉淀的代谢产物不能及时清理而逐渐聚集是血管硬化的主要原因之一。最常见的临床症状是供应给心脏自身循环的冠状动脉出现硬化，使得心脏自身的循环通路出现问题——造成心脏缺血，引起心绞痛；脑血管硬化后在高血压等因素影响下破裂形成中风；视网膜动脉硬化使得视力下降等。从细胞水平观察，溶酶体是分解异物的细胞器，若不能被其消化的产物逐渐积累，溶酶体自身就逐渐演变成脂褐素颗粒。新生儿心肌细胞内部几乎没有脂褐素颗粒，若脂褐素逐渐增加也是心肌细胞开始衰老的标志之一。单纯从发育生物学角度来看，循环系统和人体其他系统一样，自身同样要经过不断的演变以适应人体生长和发育的需求，其中最明显的循环途径的解剖学变化，就发生在出生前后。

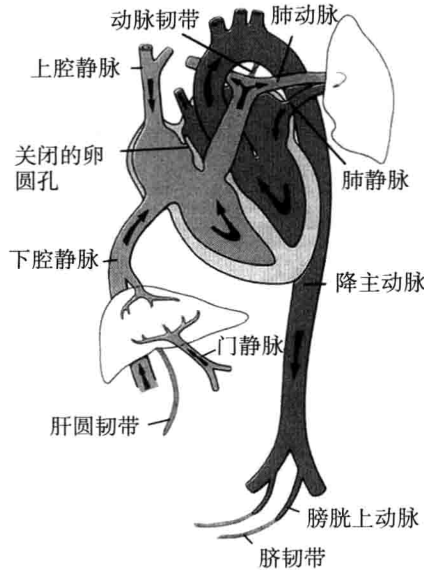


图 37 胎儿出生后循环系统的变化
（引自：Sadler TW. Langman's Medical Embryology）

2. 出生前的循环途径特点

从受精卵出现开始到胎儿出生，胚胎需要在子宫里生长和发育266天左右（临床上从怀孕前末次月经起计算，多出14天左右，即有10月怀胎之说）。正常胚胎发育出自身的血液循环系统后，脐带成为连接胎儿和母体的唯一通道。脐带内的脐静脉承载着由母体而来的营养物质和氧气，而脐动脉则负责将胎儿代谢产生的废物和二氧化碳输送给母体。在这特殊的266天中，胎儿依靠自身特有的循环方式与母体血循环连通：富含营养和氧气的血液从胎盘经由脐静脉流至肝，大部分经静脉导管流入下腔静脉，形成混合血。大部分右心房的血液通过卵圆孔进入左心房，小部分血液进入右心室入肺动脉。肺动脉内大部分血液经动脉导管入主动脉，小部分入肺并从肺静脉返回到左心房，再入左心室。左心室收集左心房的血液，进入主动脉，部分血液经脐动脉入胎盘。这种循环途径，在胎儿出生之前基础代谢较低的情况下，在肺循环尚未建立和发挥功能之前，最大限度地保证了从母体来的营养和氧气尽可能地分布到全身，同时也将胎儿自身代谢产生的废物和二氧化碳交还给母体。

3. 出生后循环途径的改变

人类是陆生哺乳动物，在出生前肺循环并不发挥功能，气体交换依赖于胎盘。出生后肺脏才成为人体唯一的气体交换器官。分娩时脐带被剪断后，卵黄囊循环和脐循环通路彻底关闭。出生后的啼哭，使空气进入肺，肺迅速扩张，使得肺循环立即建立。由于很快建立了肺循环，胎儿原有的循环通路必须重建。比如：脐静脉、静脉导管和动脉导管分别逐步退化成肝圆韧带、静脉韧带和动脉韧带，脐动脉渐渐演变成脐韧带和膀胱上动脉等。卵圆孔出生后约半年到一年内达到解剖关闭，使得混合血不复存在，彻底将动脉血和静脉血分开。这样的改变，消除了混合血的存在，彻底将动脉血和静脉血分别分流到动脉和静脉中，提高了循环系统的工作效率，以逐步适应婴儿和成人进一步生长和发育的需要。

殊途同归

从受精卵开始，细胞不断地分裂、分化，胚体自身的体积也不断增

大，但大脑能够指挥脚趾的简单事实说明细胞即使距离再远也息息相关。在复杂的发育过程中，似乎有一只看不见的手在操控，使得机体内各种结构和功能联系精确完成，而这只手与胚胎发育的基因调控和发育环境密不可分。在人体胚胎发育时期，作为循环系统重要组成部分并相互连通的心脏和血管，它们的起源部位可以说是天南海北，相距甚远。胚盘外的血岛内出现毛细血管后，胚盘内部也逐渐形成血管，并建立了胚体、卵黄囊和尿囊循环等3种循环路径，并借脐带相互连通。在血管逐渐出现的同时，在口咽膜前方的胚内中内层内出现了心管，心管不仅与周边的血管相通，而且自身将演变成推动胚体循环、卵黄囊循环和脐循环不断流动的心脏。因此，口咽膜前方的胚内中胚层和位于卵黄囊外层的胚外中胚层的血岛虽然分别位于胚体内、外不同的部位，看起来并不相关，实际上它们成为循环系统发生发育的不可或缺的心脏和血管以及造血干细胞的重要发源地，最终都融入到循环系统的建立和演变的过程中，也成为循环系统发育过程中的“殊途同归”现象。

（周劲松）

参考文献

[1] 柏树令，应大君. 系统人体解剖学. 2版. 北京：人民卫生出版社，2010

[2] Richard SS. Clinical Anatomy. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008

[3] 王平，曹焯，樊启昶，等. 简明脊椎动物组织与胚胎学. 北京：北京大学出版社，2004

[4] 杨倩. 动物组织学与胚胎学. 北京：中国农业大学出版社，2008

[5] 高英茂. 组织学与胚胎学. 2版. 北京：人民卫生出版社，2010

[6] Sadler TW. Langman' s Medical Embryology. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2010

[7] William JL. Human Embryology. Churchill Livingstone Inc, 1993

[8] Moore KL. The Developing Human. Saunders, 2003

[9] 朱芳，李振宇，任精华，等. VEGF与肿瘤血管生成拟态关系的研究. 临床肿瘤学杂志，2009，14（1）：20－24

[10] Kim NH, Pham NB, Quinn RJ, et al. R－（－）－beta－O－methylsynephrine, a

natural product, inhibits VEGF - induced angiogenesis in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 399 (1): 20 - 23

[11] Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, et al. Molecular characterization of EG - VEGF - mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. Mol Biol Cell, 2010, 21 (16): 2832 - 2843

专题 14

发育失控之痛
——胚胎发育与肿瘤

发育生物学的观点认为，肿瘤是一种细胞分化异常疾病，应属于广义上的发育生物学研究范畴。在各种致癌因子的作用下，基因表达的某些环节出现问题，导致细胞增殖和分化异常。肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭与转移等行为是一种特殊方式的“发育”。胚胎发育始于受精卵，其基因组按照特定的时空顺序选择性表达，从而进行细胞的增殖分裂以及不同种类细胞、组织和器官的分化，形成特异性分化产物和可检测的功能及形态特征。肿瘤细胞和胚胎细胞从细胞的增殖、生长与分化方面存在着诸多相似之处，它们都具有超常的分裂增殖能力和受原癌基因控制，所不同的是胚胎经过十个月的发育形成一个正常胎儿，而一个恶性变的细胞经过失控增殖也可以在数月内形成致命的肿瘤组织。然而两者的细胞增殖又具有本质的区别，前者的细胞增殖与分化受胚胎整体性的控制，后者的细胞呈相对无限制地生长、分化失常。

肿瘤细胞分化调控异常

细胞的分化与增殖存在着耦联关系，干细胞在分化的初期，细胞大

量增殖，随后在有关信号的影响下增殖逐渐减慢而出现分化特征。即干细胞分化依赖于早期的增殖信号和随后的分化信号的协调。可以认为细胞恶变是细胞增殖和分化间的耦联平衡失调的结果。细胞癌基因的激活和肿瘤抑制基因的缺失或失活在此过程中起重要作用。另一方面，肿瘤细胞的诱导分化，即重新建立增殖和分化的耦联，作为一种肿瘤的治疗手段一直受人关注。一些跨膜信号传导通路在胚胎细胞分化控制中起重要作用，但已发现在一些肿瘤中该信号转导通路存在异常。

1. Wnt 信号传导通路

（1）Wnt 基因家族及其生物学特性　Wnt 基因是鼠类乳腺癌病毒（MMTV）诱导的小鼠乳腺癌中克隆出的一种原癌基因，当时称为 int 基因（小鼠的 int1 和 int3），后来发现 int1 基因与果蝇的 Wingless（wg）基因属直相同源基因，因而将两者合称为 Wnt。它是编码早期发育过程中重要的分泌性蛋白家族的一个成员，该家族包括果蝇的 Wingless 蛋白。Wnt 蛋白是一种分泌型的蛋白质具有一个或多个 N 端糖基化的位点，大多数蛋白质由 350～380 个氨基酸组成，在整个序列中平均分布着 100 个保守的残基。一些 Wnt 基因有着附带的细胞内氨基端或羧基端的功能区。同种属的两种 Wnt 蛋白或两个物种的同源 Wnt 蛋白，其氨基酸序列都具有 30%～60% 的同源性。Wnt 基因高度保守，小鼠和人的 Wnt 基因几乎无任何差别。Wnt 基因所编码的蛋白质为一种分泌型生长因子，含有一段疏水的信号肽，后接一个可被信号肽酶识别的位点，不含跨膜功能区，富含可交联形成二硫键的半胱氨酸残基，并带有四个与 N 端相连的糖基化位点。尽管至今仍无法分离出有活性的游离的 Wnt 蛋白，但通过细胞转化实验可证明 Wnt 蛋白生物活性的存在。在对果蝇胚胎的研究中，通过免疫组化染色发现 Wg 在含有 Wg-mRNA 的细胞表面表达，并且同时出现在相邻的细胞内。这说明 Wnt 蛋白是通过旁分泌或自分泌途径发挥其在细胞间的相互联系作用。

（2）Wnt 基因对胚胎发育的调控作用　Wg 作为 Wnt1 的同源基因在果蝇胚胎体节形成中起重要作用。在果蝇胚胎发育的前几小时内，果蝇的胚胎迅速被分成小的封闭区域称为副体节，而后这种副体节进一步发育成果蝇体节，这些过程是由一些体节极性基因控制的，这些基因的

突变会引起体节极性的消失或角质层的镜像复制。Wg 的胚胎致死等位基因有很强的体节极性表型，并且所有的无效突变都发生在 Wg 的蛋白编码功能区上。当该基因缺失时角质层的裸区就会被一层连续的锯齿状结构（denticle）所替代，使副体节和体节的界限消失。Wg 的无效突变亦会引起中枢神经系统的细微缺陷。等位基因对果蝇胚胎的发育也具有重要的作用，如调控视神经盘和翅盘的形成。将 Wnt 家族中不同的 mRNA 注入蛙的受精卵会产生不同的诱导作用。如使原始轴从前端裂开，产生双头胚胎；当注射入两个卵裂球时有时会产生四个体轴；另外，经紫外线照射过的胚胎亦可通过注射 Wnt - mRNA 而恢复活性；蛙的 Wnt1、小鼠 Wnt3A、Wg 和蛙 Wnt8 的 mRNA 能诱导背轴形成。上述现象的部分原因是由于 Wnt 基因参与了蛙胚胎形成中缝隙连接的调节，Wnt - mRNA 的注入使原来处于关闭状态的缝隙连接开放，因此产生细胞间信息传递。Wnt1 基因在成年和胚胎期小鼠的特定部位均有表达，说明 Wnt1 基因在哺乳动物的发育中同样起调节作用。

（3）Wnt 基因与肿瘤细胞分化调控　Wnt 基因在生物的正常发育中是组织分化的诱导信号，但它们在通过局部作用而引发的肿瘤发生过程中亦有很大的潜能，特别是在乳腺癌的发生中。Wnt 基因在肿瘤发生中的作用可以用细胞转化实验得以证实。以小鼠 3T3、rat - 1 及 HeLa 细胞系为供者细胞，一经转染 Wnt1 基因都能使来源于正常小鼠乳腺的 C57MG 细胞系发生形态学变化，与直接用 Wnt1 转染 C57MG 细胞产生的形态学变化是一致的。除 Wnt1、Wnt3 能引起 C57MG 细胞转化外，用病毒载体分别将 Wnt1、Wnt7A、Wnt4、Wnt7B 等几种 Wnt 家族基因转入 C57MG 细胞系发现不同的 Wnt 基因引起细胞恶变的程度存在差别。小鼠转基因实验对阐明 Wnt1 在肿瘤发生过程中的潜在作用是一个很好的证据，将 Wnt1 基因转入小鼠，能产生激素非依赖性的乳腺上皮细胞增生，一年后其乳腺癌与病毒引发的小鼠乳腺癌已无区别。由此可见，Wnt1 蛋白在肿瘤发生早期是一种生长刺激因子，但在肿瘤发生晚期中的恶性转化、逃避激素依赖性及获得转移的潜能中的作用仍不清楚。

Wnt 基因在多种恶性肿瘤中的表达情况已经相继被报道。有人对 100 多份正常和肿瘤组织及 10 个人类肿瘤细胞系的研究发现，在肺、

乳腺、前列腺及黑色素瘤中存在 Wnt5A mRNA 的过度表达，并且证明 Wnt5A 的上调不是由基因重排或扩增引起的。利用半定量 RT - PCR 方法对不同分期的结肠直肠癌进行检测，Wnt2 在正常结肠组织中表达量很低，而在肿瘤组织中有过高表达，说明 Wnt2 在消化系统肿瘤的发生发展中起一定的作用。

（4）Wnt/Fz 信号传导通路　由于 Wnt 特异受体的发现，推动了 Wnt/Frizzled 系统信号传导通路的研究，该传导途径中的相关成分也逐一被阐明。由 Wnt 通过 Frizzled 下游 Dishevelled（Dsh）、Shaggy/Zeste white3（GSK3）、Armadillo（β - catanin）及其他一些基因的表达产物共同构成了 Wnt 的信号传导通路。Dsh 是果蝇细胞浆内的一种蛋白质，几乎没有同源蛋白质。Dsh 有一个 PDZ 功能区，而 Frizzled 家族的蛋白质在 C 端的相同位置都含有能与 PDZ 功能区相连接的 SXV 序列，这使 Dsh 可能与 Fz 在细胞膜处直接相互作用。

Shaggy/Zeste white3 是哺乳动物糖原合成激酶 3（GSK3）蛋白激酶的功能同源物。活化的 Dsh 可成为 GSK3 的抑制物。GSK3 的底物是一种蛋白质，这种蛋白质一经磷酸化即可阻断 Wnt 的信号传递过程，但目前还没有确切的实验来证实是哪种蛋白质。近来的研究表明，GSK3 很有可能作用于 Armadillo 或一种能与 Armadillo 相互作用的蛋白质，如结肠腺癌样息肉基因的产物（APC）。Armadillo 是哺乳动物 β - 环形蛋白（β - catanin）的同源物，环形蛋白是能与钙黏附蛋白胞浆内功能区相结合的一种蛋白质。APC 能与 α 或 β - 环形蛋白相结合并且通过促进游离 β 环形蛋白的降解来使细胞内 β 环形蛋白保持在较低水平。GSK3 可通过与 APC 结合使 APC 磷酸化，增加 APC 与 β 环形蛋白的结合，因此 β 环形蛋白的降解依赖于 GSK3 的活性。β 环形蛋白自身也可能是 GSK3 的作用底物，因为野生型的 GSK3 可在一保守型位点使 β 环形蛋白磷酸化，而且该位点的突变可增强 β 环形蛋白的稳定性。由此可见，APC 的突变或 GSK3 的失活均会通过这种网状作用导致游离 β 环形蛋白的增加。

2. 钙依赖黏附素/连环蛋白途径

肿瘤细胞黏附其他肿瘤细胞、宿主细胞或 ECM 成分的能力影响其

侵袭和转移。黏附在侵袭过程中起双重作用，一方面肿瘤细胞必须先从其原发灶的黏附部位脱离，故黏附可抑制侵袭；另一方面，肿瘤细胞又需要借助黏附才能移动，肿瘤细胞从连续的黏附和去黏附中获得运动的牵引力。如果黏附得太牢，它们又不能脱离和移动，所以侵袭和转移的过程首先是黏附和去黏附的交替过程。黏附可分为细胞与细胞黏附和细胞与基质黏附两大类，前者又可根据参与细胞的类型分为同型细胞黏附，如肿瘤细胞间的黏附，可避免肿瘤细胞彼此分离；以及异型细胞黏附，如肿瘤细胞与内皮细胞和内皮下间质的黏附，则促使肿瘤细胞穿过血管内皮，发生侵袭并易位生长。

钙依赖黏附素（Cadherin，Cad）为一组 Ca^{2+} 依赖性跨膜糖蛋白。根据组织分布的不同分成 3 种亚型：E－Cad、P－Cad 和 N－Cad（E 为上皮性，P 为胎盘性，N 为神经性）；最近又发现一些新的成员，如：V－、M－、B－、R－及 T－Cad。Cad 利用其胞外结构中“组－丙－缬”（HAV）序列来识别和介导同种细胞间的黏附反应。目前认为 E－Cad 通过 α－、β－、γ－连蛋白（catenin）与细胞骨架相连，促进同型细胞间的黏附，使肿瘤细胞之间保持密切接触，难以脱离原发肿瘤进入周围组织或血管，从而抑制肿瘤的转移。

钙依赖黏附素诱发的细胞信号转导通过 Src 家族 PTK，使连环蛋白（catenin）的酪氨酸残基磷酸化，以调节游离 β 连环蛋白水平而起作用，它与 Wnt 受体的信号转导途径会合。β 连环蛋白是 v－SrcPTK 的底物，在 v－Src 转化细胞中被磷酸化后干扰了钙依赖黏附素的功能，使细胞间黏附力下降。与钙依赖黏附素结合但不与 APC 蛋白结合的 P120 连环蛋白相关蛋白，在 EGF、PDGF 和 CSF－1 受体激活后及在v－Src 转化细胞中可被磷酸化。在人肿瘤细胞系中检到一个截短型 β 连环蛋白，可使 E－钙依赖黏附素与 β 连环蛋白的相互作用中断，并导致细胞间黏附性丧失，提示 β 连环蛋白基因突变在肿瘤中也有某些作用。肿瘤细胞有 E－钙依赖黏附素表达的下调，也观察到 E－钙依赖黏附素编码基因的突变。突变型 β 连环蛋白和 E－钙依赖黏附素可能不仅可使肿瘤细胞黏附性降低，还可上调 Wnt 信号通路。

3. Notch **通路**

哺乳细胞中已知的 4 个 Notch/Lin12 家族成员中有 3 个与肿瘤有关，

它们是 Tan1（Notch1）、Notck2 及 Int3（Notch4）。Notch 是在果蝇中最早描述的，在果蝇中当 Notch 被邻近细胞的配体 Delta 或 Serata 激活后起分化抑制的作用。Notch 的胞内近膜功能域与 Su（H）（suppressor of hairless）相互作用。当 Notch 被配体激活后，Su（H）被释放并移至核内，诱导转录阻遏子 bHLH 的表达，阻断神经系分化。在哺乳细胞至少有 4 个 Notch 家族受体和一些配体如 Jagged 等，DNA 结合蛋白 RBP－Jk/CBFl/KBF2（CBFI）为 Su（H）的同源物，bHLH 蛋白所属的 Hes 家族则为转录阻遏子 bHLH 的同源物。无细胞外功能域的 Notch 影响爪蟾胚胎细胞的命运，小鼠 Notch 的可溶性细胞内功能域可阻断 MyoD 诱导的肌发生；140tcb 细胞外功能域的截去可导致 Notch 的结构性信号发放。在人类肿瘤中同样发现有 Notch 的细胞外功能域的缺失性改变。与果蝇 Notch 基因同源的 Tan1（Notch1），最早是在人 T 淋巴母细胞性白血病的染色体 t（7；9）易位中发现的。将表达 Tan1 的重组逆转录病毒转染骨髓细胞，然后将它再接种到小鼠体内，可引发 T 细胞白血病；在 MMTV－c－Myc 转基因小鼠中发生的胸腺瘤常有全长或截短型的 Notch1 的过度表达；Int3（Notch4）是 MMTV 诱发乳腺癌中 MMTV 原病毒的常见整合部位，这导致产生 N 末端截短型的蛋白，事实上已从表达 Int3 的转基因小鼠中诱发出了乳腺癌。Notch2 是从病毒诱发的胸腺淋巴瘤中重组猫白血病病毒基因组中分离发现的，它编码的蛋白是 N 末端截短型 Notch2，定位于核内。由此可见，截短的 Notch 蛋白呈结构性信号发放而阻断细胞分化和导致持续增殖。另一值得注意的发现是 EBNA2 与 CBF1 的相互作用。ZB 病毒编码蛋白 EBNA2 为病毒和细胞基因的激活因子，是 EB 病毒转化 B 淋巴细胞所必需的。但它并不与靶基因中的 EBNA2 反应序列直接作用，而是与 CBF1 相互作用后，再启动 CBF1 结合基因的反式激活，即将一种抑制因子转变为一种活化因子，如同 Notch 结合至 CBF1 那样。

4. TNF 家族新成员与肿瘤细胞分化

诱导肿瘤细胞分化和凋亡是生物治疗达到疗效的两个关键问题。TNF 家族凋亡诱导配体及其受体是目前研究的热点，新的 TNF 家族凋亡配体 TRAIL、LIGHT 和 THANK 相继被发现，它们与肿瘤分化与凋亡

的关系亦逐渐被揭示。

（1）TRAIL　1995 年，Wiley 等首先报道发现了一种新的细胞因子，TNF 相关的凋亡诱导配体（TNF - relatedapop - tosis - inducing-ligand，TRAIL）。目前已知其有 4 种受体，DR4、DR5、DcR1 和 DcR2，它们均与 TRAIL 发生高特异的结合。初期的研究发现后两种受体由于缺乏传导凋亡信号的胞内结构，对细胞具有保护作用，故又被称为“诱饵受体”，它们主要分布于正常组织，而在转化细胞和肿瘤细胞株中不表达或低表达，因而研究者们认为 TRAIL 的杀伤作用具有选择性。如 Rieger 等的研究发现脑瘤组织中存在 DR4 和 DR5 的高表达，DR1 与 DR2 则呈低水平表达。Ashkenazi 等的研究结果表明，来源于结肠、肺、乳腺、肾、脑和皮肤的 39 种肿瘤细胞系中有 32 种对重组 TRAIL 蛋白的细胞毒作用敏感，且可能与化疗具有协同作用。Sheikh 等的研究证实，胃肠道肿瘤具有 TRAID（即 DcR1）的过量表达，并以此逃脱 TRAIL 诱导的凋亡，而 Frank 等发现脑瘤中正常和瘤组织中两类受体的表达水平相似，Thomas 等发现同一肿瘤的不同细胞系对 TRAIL 的敏感性有很大的差异。Zhang 等则发现有些肿瘤细胞尽管缺乏诱饵受体，但仍对 TRAIL 具有抵抗。研究头颈部组织肿瘤的癌细胞时发现，DR5 基因发生了突变，进而导致细胞的凋亡功能丧失。但 Arai 等的研究却表明 DR5 基因的失活与直肠肿瘤的发生无关。所以 TRAIL 尽管具有较 FasL 在保护正常细胞方面的优越性，但其对肿瘤的凋亡诱导作用仍具有不稳定性。

（2）THANK　1999 年，Mukhopadhyay 等发现了一种新的 TNF 家族成员 THANK，由 285 个氨基酸组成，为型跨膜蛋白，其氨基酸序列与该家族其他成员的同源性分别为 TNF（18%）、LTα（19%）、FasL（16%）、LIGHT（15%）。其高表达于外周白细胞、淋巴结、脾、胸腺，低表达于小肠、胰、胎盘、肺组织、造血细胞。其重组纯化蛋白重约 20kD，末端氨基酸序列为 AVQGP。大多数 TNF 家族成员都是通过激活 NF - κB 途径诱导凋亡的，THANK 亦是如此，并且其生物活性为时间及剂量依赖关系，使用单抗方法证实 THANK 包含 P50，P65 亚单位，诱导凋亡的强度小于 TNF，与 LTα 相似。THANK 亦可激活c - JunNH2

端激酶活性，为时间剂量依赖性，与 Jun 蛋白水平无关。THANK 可诱导淋巴瘤（U937）、前列腺癌（PC－3）、结肠癌（HT－29）、宫颈癌（Hela）、乳癌（MCF－7）、胚胎肾细胞（A293）等细胞的凋亡。目前的研究表明，THANK 的受体与 TNF 不同，其受体及功能尚待进一步的研究。

胚胎植入与肿瘤细胞的侵袭转移

肿瘤的侵袭转移是一种高选择性的非随机的过程，期间涉及肿瘤细胞之间及肿瘤细胞与宿主组织之间一系列复杂的相互作用。肿瘤细胞要突破宿主细胞和间质屏障，从而获得侵袭转移能力，其自身必然发生一系列相应的生化特性的改变。目前已知肿瘤转移是个复杂的连续过程，包括以下步骤：①肿瘤生长、浸润及肿瘤细胞从原位释放；②肿瘤细胞向淋巴系统或血液系统运动；③肿瘤细胞在循环中存活，并与血小板和凝血系统相互作用；④肿瘤细胞通过与远位淋巴（或血管）内皮细胞和内皮下基质相互作用而在该处停留；⑤肿瘤细胞迁移入组织实质中；⑥肿瘤细胞在组织实质中生长。整个过程有多种基因产物参与，如多种细胞黏附分子、基质分解酶、细胞运动因子、血管新生因子、生长因子等。其中由细胞黏附分子介导的肿瘤细胞之间，以及肿瘤细胞与宿主细胞间的相互作用在肿瘤转移中发挥着关键作用。

肿瘤细胞的浸润转移与胚胎植入具有很大的相似性：①它们具有相似的基质侵入行为，并用同种蛋白水解酶降解类似的细胞外基质结构；②生长因子对这两种细胞可能具有相似的调节作用；③胚胎滋养层细胞和肿瘤细胞的免疫学特性类似，并可能具有共同的免疫逃避机制。胚胎植入和肿瘤浸润的相似性提示，学科间的交叉、渗透和相互借鉴对生物学基因理论的研究具有重要意义。

1. 胚胎植入与肿瘤浸润转移间的相似性

卵子从卵巢的排放、胚胎在输卵管和子宫的运输，尤其是胚胎在子宫的植入，与肿瘤细胞从原发灶的脱离和在异位的浸润转移过程极为相

似，具体体现在以下几方面：

（1）胚胎植入的生理过程与肿瘤浸润转移的病理过程的相似性 现已清楚，在形成血绒毛胎盘的人和哺乳动物中，胚泡从透明带孵出后，滋养外胚层开始向外扩展并对细胞外基质（ECM）产生黏附性。围绕胚泡腔的壁滋养层细胞分化形成初生滋养层，穿过子宫上皮基膜和内膜血管基底膜，刺激子宫基质细胞蜕膜化。与内细胞群相连的极滋养层细胞增殖形成外胚盘锥，进而衍生出次生滋养层，向大量表达基膜样ECM的蜕膜组织侵入，建立胎盘并使胚盘深深地植入到子宫内膜。与此相似，从原发灶游离出来的肿瘤细胞突破基膜浸润正常组织，然后在结缔组织基质中移行，黏着并穿过脉管基膜进入血液循环，其中少数肿瘤细胞黏着于毛细血管或小静脉内皮下基膜，再次穿过基膜侵入远处的结缔组织，在基质和基膜上黏着、增殖，从而形成转移灶。胚胎滋养层对子宫内膜的侵入在本质上与高度侵袭性肿瘤的浸润转移相似，而且滋养层组织失去控制的侵入会造成最具转移性的绒毛膜上皮癌。

（2）参与胚胎植入与肿瘤侵袭转移的蛋白水解酶的相似性 如上所述，胚胎植入或肿瘤浸润转移要多次穿过由Ⅳ型胶原（Col Ⅳ）、层粘连蛋白（laminin，LN）、纤维粘连蛋白（fibronectin，FN）等组成的基膜或基膜样细胞外基质（ECM）。已有充分证据表明ECM降解酶的表达与胚胎植入和肿瘤细胞浸润转移密切相关。胚胎滋养层细胞和肿瘤细胞均能合成纤溶酶原激活因子（PA）和基质金属蛋白酶（matrix metallproteinase，MMP）。PA有尿激酶型（u－PA）和组织型（t－PA）两种形式，t－PA主要介导血凝块溶解。u－PA则在组织重建过程中起作用。研究发现，u－PA的表达与胚胎植入在时空上一致，而与多数肿瘤细胞浸润转移相关的也是u－PA。MMPs是一类重要的组织蛋白水解酶，其活性依赖于活性中心的锌离子。MMPs在大多数细胞中合成后立即被分泌到ECM，参与ECM的降解和重建。根据底物相对特异性，MMPs可分为三类：①间质胶原酶和多形核细胞胶原酶；②Ⅳ型胶原酶，又称明胶酶，分72kD的MMP_2和92kD的MMPs两种。③基质水解酶。研究表明，72kD的Ⅳ型胶原酶介导人类细胞滋养层的侵入，其组织抑制因子和功能干扰抗体可完全抑制细胞滋养层的侵入，而92kD的

Ⅳ型胶原酶常常在恶性肿瘤细胞中高表达。Ⅳ型胶原酶在着床前人胚胎和恶性肿瘤细胞中的表达调节非常相似，均受 LN 和基膜基质蛋白（matrigel）的诱导，其差别可能是仅在程度上有所不同。

（3）胚胎滋养层细胞和肿瘤细胞与 ECM 作用机制的相似性　ECM 是由一系列生物大分子组成的动态网络结构，能维持多细胞生物的结构完整性，并对细胞增殖、分化、黏附和迁移具有重要的调节作用。胚胎滋养层细胞和肿瘤细胞与基膜或基膜样 ECM 中的糖蛋白 LN 的相互作用，对胚胎植入和肿瘤浸润转移极为重要。LN 受体分整合素和非整合素两类。整合素是一组二价离子依赖性细胞表面糖蛋白，介导细胞间及细胞与 ECM 间的黏附反应。每种整合素都是由 α、β 亚单位以非共价键结合的异二聚体。整合素分子结构或表达水平的改变与胚胎滋养层细胞的侵入或肿瘤细胞的浸润转移行为有密切关系，如 α6、α7 亚单位的表达与胚泡获得黏附和侵入能力相关，并分别在结肠癌和黑色素瘤中有高表达。非整合素类的 LN 受体，如 67kD 的 LN 结合蛋白（LBP），参与胚胎滋养层细胞在 LN 上的扩展过程；67kD 的 LBP 在乳腺癌、结肠癌和肺癌细胞中高表达，与肿瘤细胞的转移能力密切相关，例如高转移的人肺巨细胞癌细胞比低转移的肺腺癌细胞有更高的 67kD 的 LBP 基因表达水平。

（4）生长因子在胚胎植入与肿瘤浸润转移中作用的相似性　生长因子在胚胎植入和肿瘤浸润转移过程中均起着重要的作用。实验表明，胚胎植入依赖于卵巢激素诱导子宫内膜分泌表皮生长因子家族成员，如表皮生长因子（EGF）、转化生长因子 α（TGF - α）和肝素结合表皮生长因子（HB - EGP）等。胚胎滋养层细胞存在 EGF 受体，EGF 能通过诱导 u - PA 和 MMP 的表达促进滋养层细胞的侵入。EGF 及其受体与细胞转化有密切关系。对 EGF 受体氨基酸顺序分析发现，EGF 受体和一种引起鸟类成红细胞瘤的病毒癌基因（V - ver - B）产物有高度同源性。V - ver - B 基因产物是一个“去两端”的 EGF 受体。EGF 受体的持续激活可能是导致细胞癌变的原因之一，EGF 可作为一种肿瘤促进因子增强病毒或化学致癌剂的致癌作用，并通过上调 EGF 受体的表达增强肿瘤的浸润转移能力。

（5）胚胎滋养层细胞与肿瘤细胞在免疫学上的相似性　肿瘤与早期胚胎组织往往具有共同的抗原性及免疫现象。迄今，在肿瘤中发现的胚胎抗原已有癌胚抗原、α甲胎蛋白、γ甲胎蛋白、硫糖蛋白、胎铁蛋白、T球蛋白和乙胎蛋白等。肿瘤组织具有胚胎性抗原以及胚胎细胞与肿瘤细胞表面的相似性，提示在胚胎植入和肿瘤浸润转移过程中胚胎滋养层细胞与肿瘤细胞具有共同的免疫逃脱机制。虽然胚胎对母体来说，在免疫学上是不相容的半抗原，但胚胎能顺利植入子宫内膜而不被排斥，胚胎滋养层细胞主要组织相容性抗原（HLA）表达的调节在其中起着重要作用，例如刺激移植排斥反应的多态性Ⅰ类HLA－A、HLA－B、HLA－C基因在胚胎滋养层细胞不表达；而非多态性基因HLA－G在滋养层细胞则有表达。类似地，肿瘤细胞也选择性抑制HLA－A或HLA－B的表达。

（6）胚胎的血管建立与成瘤组织的血管生成的相似性　细胞在缺氧环境下可诱发一系列的生物学反应，其中就包括介导细胞增殖、血管生成及死亡信号途径的活化，肿瘤细胞同样对缺氧有这种反应，肿瘤的这种缺氧适应与其预后不良和对放疗不敏感有直接关系，因而，阻断肿瘤细胞缺氧适应的信号转导通路可能成为肿瘤治疗的重要方法之一。

总之，胚胎植入与肿瘤侵袭转移在发生过程、降解ECM的酶类、与ECM的作用机制、对生长因子的反应性以及免疫学特性等方面均具有惊人的相似之处，甚至在一定条件下，正常胚胎细胞可以发展成为肿瘤，而肿瘤细胞在一定条件下可以参与正常组织的形成。事实上，胚胎植入与肿瘤浸润转移的相似性有其内在的本质联系。

2. 探讨胚胎发育与肿瘤形成关系时应注意的问题

（1）在研究胚胎植入机制的同时，应密切关注肿瘤学的研究进展　人类血绒毛胎盘的形成非常类似于侵袭性肿瘤的浸润转移过程，以致正常滋养层被称为“假恶性的（pseudo maligant）”。滋养层细胞侵入和肿瘤浸润转移都必须具备对基膜的侵蚀能力，事实上，人们对滋养层细胞的认识许多是来自关于肿瘤细胞浸润转移的研究。因此，借鉴肿瘤学的研究成果，能拓宽生殖生物学家的研究视野。最近，已有研究者将阻止肿瘤细胞与LN相结合的物质可抑制实验性肺转移的思路应用于胚胎植

入研究，发现 LN 抗体、LN 受体抗体以及 LN 活性位点的合成肽段能抑制滋养层细胞黏附、扩散和迁移，并有抗植入效应。

（2）肿瘤浸润转移的防治研究不妨吸收胚胎置入机制的研究成果在正常妊娠过程中，胚胎滋养层对于宫内膜的侵入受到精确调控。植入启动只能发生在特定的时间和特定的部位（子宫隐窝），而当胚胎植入到一定程度时，该过程即自动终止。肿瘤学家无疑将会从这一精确调控过程中得到极大的启发。例如 TGF－β 促进 ECM 的合成和人细胞滋养层细胞向非浸入性的合体滋养层细胞的分化、降低蛋白水解酶的分泌以及诱导 PA 和 MMP 抑制因子的表达，从而限制胚胎滋养层的过分侵入。已有将 TGF－β 用于抑制肿瘤细胞扩散并取得一定效果的报道。

发育异常与肿瘤

肿瘤的发生是由于持续存在于成体内的胚胎细胞的增殖。早在 19 世纪，肿瘤的胚胎来源学说得到广泛的支持。在当时的条件下，发现胚胎组织与肿瘤组织有许多相似之处。但后来有人将胚胎组织接种到成年动物体内，并出现肿瘤；再则随着显微技术的突飞猛进，人们对肿瘤进行了细致的分类，肿瘤的胚胎性起源的假说才逐渐被人们所遗忘。然而，最近半个世纪的时间里，随着细胞生物学、分子肿瘤学、实验胚胎学、实验肿瘤学以及免疫胚胎学的发展，累计了大量资料，表明肿瘤是胚胎性基因产物的表现，或者是人体中癌基因的激活与大量表达的结果。我们有必要重新评价胚胎发育异常与肿瘤形成的关系。

1. 肿瘤细胞的扩散与胚胎细胞的迁移

肿瘤细胞从原发部位脱离下来，扩散到机体的其他部位与胚胎细胞的迁移颇为相似。原始生殖细胞最早见于胚胎的卵黄囊壁，以后迁移至生殖腺内，在此进一步增殖与分化。神经嵴细胞（neural crest cells）也要迁移到体内多个区域，成为周围神经系统中所有躯体和内脏感觉神经元的来源。视神经细胞也要迁移到眼顶盖层（optic tectum）。

胚胎细胞迁移的机制可能也与肿瘤播散的机制相同。Barbera 等曾

提出视神经从视网膜迁移至眼顶盖层可能与特异性黏附识别（specific adhesive recognition）机制有关。Nicolson 和 Winkelhake 也提出从原发性肿瘤脱落下来的癌细胞在特殊部位形成继发性肿瘤是因为它们在这一特定区域有最佳的附着。譬如将恶性黑色素瘤细胞与正常体细胞一起旋转，结果显示黑色素瘤细胞与肺细胞比起与其他细胞来更容黏附在一起。体内实验也证明，肺是发生继发性肿瘤最多的那位。因此，正如黏附识别控制了胚胎细胞迁移至胚胎特定部位一样，它也控制了继发性肿瘤形成的那位。

2. 肿瘤细胞有胚胎性基因的表达

已有大量证据表明，肿瘤的形成是胚胎性基因重现与过表达的结果，癌基因本来就是生命必需的基因，尤其为早期胚胎发育所需要的观点。这一点我们将在以后讨论。

现已证明许多恶性肿瘤可以分泌某些异位激素。目前认为异位激素的产生是正常失活的基因去抑制的缘故，也可能是由于编码异位蛋白的 mRNA 增多所致，与胚胎发育有关的异位激素见表 2。从表 2 中可以看出，能分泌异位激素的肿瘤涉及消化系统、呼吸系统、生殖系统以及神经系统等。肺癌也是最常见的产生异位激素的肿瘤之一。一般认为，这类肺癌来自胚胎的神经峭，而神经峭在胚胎发育过程中可以衍生为多种内分泌器官的某些成分。

为什么特殊异位激素的产生仅限于某些肿瘤，而不是所有肿瘤都产生异位激素呢？这个问题目前仍未完全阐明。一般认为，肿瘤或多或少地由于去分化而回到胚胎的形式。例如几乎所有的肝细胞瘤、某些膜腺癌、胃癌、肺腺癌都可以产生 aFP，这些肿瘤的来源和胚胎卵黄囊内胚层有关，而卵黄囊内胚层则是 aFP 产生的胚胎位置。

肿瘤形成过程中有胚胎性基因表达另外一个强有力的证据是：肿瘤与早期胚胎组织往往具有共同的抗原性及免疫现象。迄今，在肿瘤中发现的胚胎抗原已有癌胚抗原、α－甲胎蛋白、γ－甲胎蛋白、硫糖蛋白、胎铁蛋白、T－球蛋白、乙胎蛋白等。肿瘤组织具有胚胎性抗原，以及胚胎细胞与肿瘤细胞表面的相似性，提示肿瘤细胞与胚胎细胞具有共同的免疫逃脱机制。例如，用胚胎细胞或经射线照射的肿瘤细胞都可使动

物获得免疫性，这也证明肿瘤具有那些与免疫逃脱有关的早期胚胎发育基因产物的重现机制，从而使肿瘤细胞能够存活下来。有人认为，这些基因的重现可能是恶性转化必需的步骤。

表2　肿瘤细胞分泌的异位激素

激素	肿瘤
人促性腺激素	肺癌、肝癌、纵隔畸胎瘤
促红细胞生成素	肝癌、小脑血管瘤
促肾上腺皮质激素（ACTH）	肝癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、胸腺癌、卵巢癌
黑色素细胞刺激素（MSH）	乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、腮腺癌、食管癌、肝癌
抗利尿激素（ADH）	肺癌、十二指肠癌、胰腺癌
甲状旁腺激素（PTH）	肺癌、胰腺癌、肝癌、结肠癌、腮腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肾癌
促甲状旁腺素（TSH）	支气管癌
促性腺激素释放激素（GnRH）	乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌、垂体瘤、子宫内膜癌
生长激素释放抑制激素（SOM）	胰腺癌、胃癌、肝癌
瘦素（Leptin）	乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、子宫内膜癌
胃促生长素（Ghrelin）	胃癌、甲状腺癌、结肠癌

3. 胚胎发育异常与肿瘤形成关联的证据

畸胎瘤是从生殖细胞衍生而来的肿瘤。这些肿瘤常常与早期胚胎不易区别，而且在事实上如果将它们置于体内适当的部位，它们可以像正常胚胎那样分化发育。对畸胎瘤以及其他肿瘤细胞表面进行分析，可证明它们具有特异性的胚胎抗原。这便提示某些在肿瘤中处于激活状态的基因同样地也存在于胚胎中，但正常成体细胞极少有这些抗原的呈现。

（1）畸胎瘤　小鼠畸胎瘤可以从某些株系的幼年小鼠睾丸中分离得到，并且还可以移植于其他小鼠或以组织培养来维持。当把畸胎瘤细胞接种于小鼠体腔，它们可发育成为漂浮生长的细胞团，即胚胎样小体。这些细胞团与正常6天龄小鼠胚胎相似。若它们在小鼠的眼窝内生长，则可分化为多种组织。将它们保留在小鼠体腔内，胚胎样小体可继续很快地增殖，同时形成腹水。Mintz 和 Illmansee 曾分离出畸胎瘤细胞并将它们移植至另一品系的小鼠早期胚胎的胚泡内。将这些胚泡植入至

另一雌鼠的子宫内，这种胚胎可发育成为正常的、不长有肿瘤的成年小鼠。小鼠的某些成体组织从正常小鼠胚胎细胞发育而来，而另一些组织可以从畸胎瘤细胞发育而来。畸胎癌细胞有它自己的基因型的标志，正常胚泡细胞也有它们的基因型标志。这些标志包括株系特异的酶、血红蛋白、免疫球蛋白和色素等。因此，正常小鼠部分是由癌细胞发育而来的，证明畸胎癌细胞能分化成为正常成体组织，由此证明了正常胚胎细胞和某些肿瘤细胞之间的最终关系。在某种条件下两者都能分裂，保持相对不分化的状态，而在另一种条件下，它们能够分化成为正常的成体组织。

畸胎瘤还可用于其他方面的研究，如以它来探讨细胞生长和细胞分化所需的条件，以及它们的良性和恶性状态的转化。畸胎瘤细胞对于这些方面的研究是最好的材料，因为它们可以在小鼠体腔内，也可在体外培养条件下大量地生长。如果将这些细胞维持于体腔内自由悬浮的状态，它们保持恶性的性质，但如果将它们植入胚胎胚泡内或皮下，它们能分化成为正常组织。由于这些原因，畸胎瘤可以提供我们许多有关恶性和良性状态之间以及细胞生长和细胞分化关系方面的有用信息。

（2）印迹基因与胚胎性恶性肿瘤　如果某个基因位点成为单等位基因表达，即父源性与母源性的基因拷贝不能同时表达，且通过某种特异的基因修饰机制特异地抑制另一父源或母源的染色体等位基因表达，称之为印迹基因（imprinted gene）。父源性的基因拷贝表达，母源性的基因拷贝不能表达，称之父源性印迹基因；反之，母源性的基因拷贝表达，父源性的基因拷贝不能表达，称之母源性印迹基因。

印迹基因突变是肿瘤发生的诱因之一，即印迹的肿瘤抑癌基因仅需一次打击就可能使其得到抑制或消除，因而提高了肿瘤形成的易感性。印迹基因与肿瘤发生最直接的证据来自对肾母细胞瘤和横纹肌肉瘤的研究，这两种肿瘤中存在 $11P^{15}$ 母源性等位基因的绝对丢失。在一些儿童肿瘤如肝母细胞瘤中也有个别印迹基因丢失的现象，在成人乳腺癌和肺癌中同样观察到了这一现象。很多肿瘤中存在 $11P^{15.5}$ 上等位基因丢失的亲源性偏差现象提示，肿瘤的发生中可能有两种情况：一是母源性抑癌基因的丢失；二是通过基因的复制获得父源性生长启动子，亦可能是通

过父源性生长启动子的获得促进了母源性抑癌基因的丢失，虽然迄今在 $11P^{15.5}$ 尚未发现公认的肿瘤抑制基因，但发现许多肿瘤抑制基因与肿瘤的发生相关。IGF－2 是父源性印迹基因，其在一些恶性肿瘤中是重要的自分泌生长因子，70% 的肾母细胞瘤病例中有 IGF－2 双等位基因的表达，说明存在印迹基因丢失或松弛现象（loss of imprinted gene，LOI）。H19 为母源性印迹基因，属非转录 RNA，是目前较公认的肿瘤抑制基因，在肾细胞瘤和其他肿瘤中存在 H19 的表达减少甚至消失。P57KIP2 是目前 CDKI 家族中所知的唯一一个母源性印迹基因，由于人类 P57KIPS 是 CDKI 家族母源性印迹，人类 P57KIPS 定位于 $11P^{15.5}$，可能为一种抑癌基因，伴有母源性杂合性丢失而使 P57KIPS 不表达。P57KIPS 表达减少在一些肾母细胞瘤中较为突出，但它的表达及印迹状态在大多数肿瘤中未见报道。TSSC3 和 TSSC5 是最近在 $11P^{15.5}$ 发现的 2 个印迹基因，它们与胚胎性恶性肿瘤发生亦有一定的联系。

（3）癌胚抗原与胚胎发育和肿瘤发生

①癌胚抗原及其基因家族：癌胚抗原（carcinoembryonicantigen，CEA）是加拿大学者 Gold 和 Freedman 于 1965 年首次在人结肠癌组织中发现并提取出的糖蛋白，由于此抗原也存在于 8～12 周胚胎的胃肠、肝和胰腺等组织中，故名 CEA。它在胚胎期间表达而在出生后显著减弱或消失，但在肿瘤发生、组织增生与修复时又重现，表明 CEA 在胚胎早期发育和肿瘤发生中起着重要作用。CEA 的分子量为 18kD；cDNA 测序和分子克隆分析表明，CEA 由 5 个区构成，C 端由 34 个氨基酸构成前导肽，N 端为 108 个氨基酸残基，中间为与免疫球蛋白（Ig）高度同源的 3 个重复序列。在弱碱性条件下，CEA 具有 β 球蛋白电泳的活性，CEA 基因位于人类 19 号染色体长臂上。CEA 具有类似免疫球蛋白（Ig）的结构，其编码基因属 Ig 基因超家族，现已在 CEA 基因家族中发现 30 个基因，其中 17 个具有转录活性，且具有高度同源性。CEA 基因家族可分为两个亚群，其中一个亚群主要为整合膜蛋白，包括编码 CEA 和非特异性交叉反应抗原（NCA）及胆汁糖蛋白（BGP）基因群，另一亚群为编码妊娠专一性的 β－1 糖蛋白（PSG1）基因。

②CEA 在胚胎发育和肿瘤发生中的作用：对大鼠胚胎发育过程中

CEA 基因表达的研究发现，妊娠第 10 天的间充质细胞中即呈 CEA 阳性，妊娠第 13 天可在胚胎骨骼系统中检测到，从妊娠第 15.5 天开始，小肠、胃黏膜下层、肌层和结缔组织一直到出生后均呈 CEA 阳性，随后在支气管、平滑肌、血管壁以及真皮层、胎盘中均可测到。CEA 在胚胎发育中起重要作用。其基本功能是作为嗜同种或嗜异种细胞黏附分子。CEA 为 Ca^{2+} 非依赖性细胞间黏附分子，与细胞识别、黏着、器官的发生有关，这一点与其他钙非依赖性细胞黏附分子如神经细胞黏附分子和钙依赖黏附蛋白相似。实验研究证明，CEA 可介导人结肠癌细胞（LS－180）和转染人 CEA 动物细胞的同型细胞凝集，并且可促进同源细胞群中的同型细胞类聚。在早期胚胎发育阶段，上皮为复层的人胃肠道上皮细胞可产生大量 CEA，可持续到 20 周，且 CEA 分布于上皮细胞之间及细胞基底面，提示在胚胎发生过程中 CEA 是重要的细胞黏附分子。另有报道，未分化细胞表面 CEA 表达增加，并可促进未极化细胞形成细胞连接。CEA 的异位表达可改变成肌细胞的功能，阻止成肌细胞的融合和分化机制，维持其分裂增生潜能。人 CEA 还可能作为辅助因子，调节胶原蛋白受体的功能活动，进而调节细胞与基质间的相互作用。此外，CEA 还有免疫调节作用。CEA 作为肿瘤标记物已用于临床肿瘤患者的诊断，特别是在胃肠道肿瘤诊断方面是一个重要的筛选指标之一。在妇科肿瘤患者的肿瘤组织及血浆中可检测到 CEA，其中子宫颈原位癌占 38%，子宫颈浸润癌占 57%。子宫颈癌和卵巢肿瘤患者的血浆与肿瘤组织中的 CEA 水平与肿瘤分型有关。目前通过检测肿瘤的 CEA 阳性率，可了解一些肿瘤的分化程度、病理分级及临床分期，以此评价肿瘤的复发、疗效和预后。

胚胎 CEA 和肿瘤 CEA 在理化性质及氨基酸构成上相似，提示两者可能由相同基因编码和调控。随着胚胎的发育成熟，CEA 基因关闭，患肿瘤时该基因又打开。深入研究 CEA 基因表达的调控和生物学作用，对揭示胚胎生长发育和肿瘤癌变的机制具有重要意义。

随着分子生物学和分子胚胎学等学科的发展，尤其是癌基因的发现，也使得人们认识到肿瘤形成与胚胎发育间的联系，从而使得肿瘤学与发育生物学又一次地紧密综合了起来。胚胎发育是播种生命之苗，肿

瘤的发生则是叩击死亡之门，这两个不同的生理和病理过程研究的交叉与渗透，不仅能加速生殖生物学和肿瘤学自身的学科发展，而且对提高人口素质和健康状况具有重要的意义。

（赵　洁　张金山）

参考文献

[1] 安靓. 医学发育生物学. 北京：人民卫生出版社，2002

[2] 裴雪涛. 干细胞生物学. 北京：科学出版社，2003

[3] 章静波. 胚胎发育与肿瘤. 北京：北京医科大学与中国协和医科大学联合出版社，1991

[4] Lamy S, Gingras D, Beliveau R. Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. Cancer-Res, 2002, 62 (2): 381 – 385

[5] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. Cell, 2006, 127: 679 – 695

[6] Madamanchi NR, Hu ZY, Li F, et al. A noncoding RNA regulates human protease – activated receptor – 1 gene during embryogenesis. Biochim – Biophys – Acta, 2002, 1576 (3): 237 – 245

[7] Natoli TA, Liu J, Eremina V, et al. A mutant form of the Wilms´tumor suppressor gene WT1 observed in Denys – Drash syndrome interferes with glomerular capillary development. J – Am – Soc – Nephrol, 2002, 13 (8): 2058 – 2067

[8] Oh J, Takahashi R, Kondo S, et al. The membrane – anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell, 2001, 107 (6): 789 – 800

[9] Pinto D, Clevers H. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. Biol Cell, 2005, 97: 185 – 196

[10] Preclikova H, Bryja V, Pachernik J, et al. Early cycling – independent changes to p27, cyclin D2, and cyclin D3 in differentiating mouse embryonal carcinoma cells. Cell – Growth – Differ, 2002, 13 (9): 421 – 430

[11] Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al. Postnatal vasculogenesis. Mech – Dev, 2001, 100 (2): 157 – 163

[12] Ruland J, Sirard C, Elia A, et al. p53 accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking tsg101. Proc – Natl – Acad – Sci – U – S – A,

2001, 98 (4): 1859 - 1864

[13] Toder V, Carp H, Fein A, et al. The role of pro - and anti - apoptotic molecular interactions in embryonic maldevelopment. Am - J - Reprod - Immunol, 2002 , 48 (4): 235 - 244

[14] Vernon AE, Devine C, Philpott A. The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in Xenopus. Development, 2003 , 130 (1): 85 - 92

[15] Visvader JE. Cells of origin in cancer. Nature, 2011, 469: 314 - 322

专题 15

他山之石

——发育生物学相关技术

发育生物学的研究技术涉及细胞生物学、遗传学、生物化学的研究方法，特别是分子生物学技术的革命。因而发育生物学研究技术的发展有赖于其他学科研究技术的推陈出新，可谓是他山之石，可以攻玉。可供发育生物学研究的技术方法很多，并且日新月异，这结技术革新正在推动发育生物学进入一个快速发展的时代。

基因差异筛选

随着分子生物学技术和其他学科技术的相互交叉和渗透，芯片技术得以发现并开始应用到生物学领域的各个方面。DNA 芯片技术是生物芯片的一种，是指利用大规模的集成电路手段控制合成成千上万个核苷酸探针，按一定的顺序排列在固相载体的表面，探针可以是 cDNA 探针，也可以是寡聚核苷酸探针。

在检测差异表达基因时，首先将不同组别的 cDNA 分别用不同的荧光标记，然后一起和 DNA 芯片上的探针杂交。杂交结束后，两组

同时表达的基因显示混合色，而每一种单独表达的基因则显示不同的颜色。这样利用 DNA 芯片与不同组织来源的 cDNA 进行杂交，比较不同的杂交结果，就可以得到两个或者是更多组织来源的差异显示基因。

虽然利用 DNA 芯片来获得差异表达基因简便、快捷、灵敏度较高，但目前 DNA 芯片的应用价格昂贵，且其本身还带有许多技术问题。其中最主要的问题是重复性、探针的灵敏度、信号检测的非线性和 cDNA 相似序列引起的探针交叉杂交以及数据的可比性等等。更严重的甚至是在进行 DNA 芯片实验之前，cDNA 中的序列就可能存在着 30% 的错误率。但总的来说，随着人和小鼠基因组计划的完成及进一步完善研究，目前各类芯片的发展为医学发育生物学领域各层面的研究提供了新的入手点。

1. CGH 芯片

染色体水平的缺失、扩增等已经作为疾病的一项生物标志。科学家以往通过运用传统的染色体核型分析方法来分析染色体结构的变异。但传统的方法分辨率低，不能覆盖全基因组，难以提供染色体变异位点的精确定位。基于基因芯片的比较基因组杂交技术，aCGH（array - based Comparative Genomic Hybridization）能克服上述缺点。这种方法常用于比较物种内不同亚种或亚型差异，以发现基因组区段的变异，确定基因型特征。

aCGH 以密集探针实现基因组覆盖，因此能够同时检测基因组中多个位点、细微的基因拷贝变化。检测通常采用不同荧光素分别标记两份样品（如对照样品和检测样品），混合后在一张芯片上进行杂交，从而快速、直观地检测两样品之间基因组 DNA 拷贝数差异，通过分析比较得出在检测样品中基因组发生的缺失或扩增。例如肿瘤遗传学的研究，aCGH 可以提供一个全基因组扫描图，形象地表现出在整个染色体组的哪个部位存在 DNA 的缺失或扩增，而这些部位就可能包括了一些抑癌基因/癌基因。最近几年，aCGH 可以提供一个全基因组扫描图，形象地表现出在整个染色体组的哪个部位存在 DNA 的缺失，方法同染色体显微切割技术（chromosome microdissection）以及荧光原位杂交技术

(fluorescence in situ Hybridization，FISH）相结合，使越来越多的肿瘤相关基因被精确定位。

2．**基因表达谱芯片**

基因表达谱芯片一般采用cDNA或寡核苷酸片段作探针，固化在芯片上；将待测样品（处理组）与对照样品的mRNA以两种不同的荧光分子进行标记，然后同时与芯片进行杂交，通过分析两种样品与探针杂交的荧光强度的比值，来检测基因表达水平的变化。基因表达谱常被称为是某一生理/病理现象的“分子图像”。这类复杂的“分子图像”，可用于同时检测成千上万个基因的表达水平，再经专门的计算机软件解读出来。研究人员通过比较源于不同病理条件下的“分子图像”的结果，可以识别出引发癌症等复杂疾病的标志物（marker)。目前，这些标志基因（marker genes）还有待于大量工作对其作进一步验证。许多科研人员已把注意力投向密度相对较低的功能分类基因芯。如果研究对象是某一生物学通路的基因，使用针对该类基因的功能分类基因芯片比使用高密度表达谱芯片更加有效便利。这种将微列阵技术与特定生物学通路(specific biological pathways）最新知识有机结合而制成的功能分类基因芯片，可以大大缩短发现诊治各种疾病的生物学标志物（biomarkers）的时间。

3．**miRNA芯片**

microRNA（miRNA）作为21世纪生命科学研究最为重大的发现，已经在短时间内成为了世界顶尖科学家研究的焦点。这些发现为我们勾勒了一个全新的、原本不为人知的基因转录后调控系统，极大地扩展了人类对于基因调控方式的认识。miRNA通过RNA干扰这种独特的方式影响着生命活动中的诸多方面，包括胚胎的分化、发育；细胞的凋亡；肿瘤的发生、发展、耐药等方面，以这些突破性进展为基础，而且miRNA也已经成为科学研究的重要工具和多种疾病治疗的新手段。

由于miRNA本身分子片段小，种类多，丰度低，要总览miRNAs的全局表达和相互关系、不同条件下表达差异、特别是与疾病的关系，以及miRNA靶基因和功能研究等等，芯片技术无疑是很好的选择。这一技术的原理是收集待测样品中的miRNA，通常待测样品中的miRNA

3端会标记上荧光基团，再与特定芯片上互补的探针杂交，杂交洗涤后可扫描荧光强度，大量数据处理后便可筛选出有显著表达差异的miRNA。由于芯片技术采用大规模微阵列技术，一张芯片上可以同时分析成百上千的探针，大大提高了筛选的速度和通量，因此是miRNA高通量研究的首选。而且由于miRNA芯片的高通量特点，比较于Northern杂交、RT-PCR、液相杂交等方法，miRNA芯片技术是一种更理想的快速有效的检测miRNA表达图谱的方法。

不过需要指出的是，miRNA芯片方法并不适用于新miRNA的发现鉴定，此类研究可能需要用到一些新技术，比如miRNA研究奠基人新开发的True单分子测序技术（True Single Molecule Sequencing），以及约翰霍普金斯大学等发现了新型分析技术：miRAGE等。

4. 甲基化芯片

表观遗传改变可以定义为基因的遗传性或获得性改变，但是这种改变和DNA序列改变无关。DNA甲基化是最为常见的表观遗传改变；启动子或第一外显子CpG岛中的甲基化改变将导致基因表达失活。CpG岛的异常甲基化是导致基因沉默和过度表达的最主要的改变，常规的方法不能在全基因组水平上对甲基化进行检查，表观遗传分析与基因芯片技术结合起来则可以高通量进行甲基化的定性、定量分析。

目前建立了2种基于芯片的甲基化分析方法：一个是甲基化特异寡核苷酸芯片（methylation specific oligonucleotide arrays，MSO）方法，另一个是差异甲基化杂交法（differential methylation hybridization method，DMH）。第一种方法利用直接杂交原理，只是在标记前先用亚硫酸氢钠处理DNA，从而使所有未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶并不受该处理的影响，仍旧为胞嘧啶。这种方法一般针对已知个别基因的调控区进行研究，不能对大量基因尤其是未知基因的甲基化分析。

DMH法和表达谱基因芯片类似，最初，DMH应用于尼龙膜对人类乳腺癌细胞系中的CpG岛进行分析，后来被应用于玻璃芯片以提高检测通量。在对乳腺癌的表观遗传学改变分析中发现，CpG岛的过甲基化可以导致抑癌基因的沉默，以及在一些细胞表现下调。通常，低分化的肿瘤组织比中度分化或分化良好的正常组织表现更高的甲基化程度。不同的

甲基化谱反映了肿瘤的不同阶段或不同类型。CpG 岛的高甲基化位点与肿瘤发生相关，因此可以作为特定肿瘤亚型独特的后天标记。因此，就像基因表达谱，基于甲基化谱的聚类分析也可以用于分析肿瘤的亚型。这些基础研究具有潜在的应用价值，应用研究的方向包括，对肿瘤相关的 DNA 甲基化模式为基础的辅助诊断方法的研发，和通过抑制肿瘤细胞的 DNA 甲基化的或组蛋白去乙酰基化的方法及药物来治疗肿瘤。

5. **蛋白芯片**

基于 DNA 双链互补配对进行高通量杂交检测的芯片技术，目前主流的就是上述四种方法，分别对应于 DNA 不同层面的研究。随着蛋白抗体的商品化进程大大的发展，蛋白芯片也应时而生，基于抗原抗体反应通过靶分子和捕捉分子相互作用来监测蛋白分子之间的相互作用。捕获分子一般都预固定在芯片表面，由于抗体的高度特异性和与抗原强结合特性所以被广泛地用作捕获分子。对于研究蛋白芯片的研究在芯片表面有效固定抗体是非常关键的，特别是在固定抗体一致性方面非常关键对于增强蛋白芯片的灵敏度。G 蛋白是一种抗体结合蛋白，特异意结合抗体 FC 片段，因此已被广泛地用于固定不同类型的抗体。

蛋白组学研究是继基因组学研究后的生命科学发展的一个大方向之一。蛋白质的结构和功能最终直接影响着生命活动的变化，基因转录水平的研究只能在一定程度上反映基因表达产物的变化，而真正发挥功能的蛋白要经过转录后加工、翻译调控以及翻译后加工等许多步骤和调控才能形成，因而对蛋白质的直接研究才能真实的解释各种生命现象。但是目前研究蛋白质的手段和方法还没有很大的发展，所以寻找有效、快捷的蛋白分析技术成为了至关重要的一个环节。蛋白芯片技术的出现给蛋白组学研究带来新思路。蛋白组学研究中一个主要的内容就是要研究在不同生理状态或病理状态下蛋白水平的量变，微型化、集成化、高通量化的抗体芯片就是一个非常好的研究工具，它也是蛋白芯片中发展最快的芯片，而且在技术上已经日益成熟。这些抗体芯片有的已经在向临床应用上发展，比如肿瘤标志物抗体芯片等，还有很多已经用在研究的各个领域里。

基因差异鉴定

各类商品化芯片的出现，不论是用于各种疾病的检测，还是用于不同层面的基础医学研究，芯片都提供了很好的工具。但是目前由于芯片技术的自身条件还不够完全成熟，所以在灵敏度，特别是重复性上都存在或多或少的问题。而且芯片的高通量差异筛查只是为医学检测或基础医学研究提供了切入点，因此对于芯片的结果还需要进一步的常规实验方法进行验证。针对 DNA 芯片常用 Northern blot 方法进行鉴定，但由于实时荧光定量 PCR 方法对研究人员的技术操作要求不太高，且方法相对简便，也是大多研究人员用于鉴定的方法。针对蛋白芯片结果的鉴定，主要是应用 Western blot 方法。

1. **实时荧光定量** PCR

实时荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出，由于该技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃，而且与常规 PCR 相比，它具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点。实时定量 PCR（real - time quantitative PCR）是指在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量，并据此推断目的基因的初始量，不需要取出 PCR 产物进行分离。目前实时定量 PCR 作为一个极有效的实验方法，已被广泛地应用于分子生物学研究的各个领域。实时定量 PCR 的方法现已成为核酸水平定量检测的主要工具，一方面它与其他分子生物学技术相结合使定量极微量的基因表达成为可能；另一方面荧光标记核酸化学技术的发展，使定量 PCR 技术有一个足够的基础为广大临床诊断实验室所接受。

所谓实时荧光定量 PCR 技术，是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

Real - time PCR 常用的两种方法分别为 SYBR green（荧光染料掺入法）和 Taqman probe（探针法）。SYBR green 法是指在 PCR 反应体

系中，加入过量 SYBR 荧光染料，SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后，发射荧光信号，而不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。由于 SYBR green 法对 DNA 模板没有选择性，适用于任何 DNA，且使用方便，不必设计复杂探针，非常灵敏又便宜，因此目前应用较广泛。下面将以该方法简单介绍 Real - time PCR 的实验流程中要注意的问题。

不同组织样本的 RNA 提取适用不同的提取方法，因为 Real - Time PCR 对 RNA 样品的质量要求较高，所以，正式实验前要选择一款适合自己样品的提取方法，在实验过程中要防止 RNA 的降解，保持 RNA 的完整性。总 RNA 的提取过程中，注意避免 mRNA 的断裂；取 2μg 进行 RNA 的甲醛变性胶电泳检测，如果存在 DNA 污染时，要用 DNase I 进行消化（因为在处理过程中 RNA 极易降解，建议体系中加入适量 RNA 酶抑制剂）。

Real Time PCR 时，用于 SYBR Green 法的一对引物与一般 PCR 的引物，在引物设计上所要求的参数是不同的。引物设计的要求：

（1）Tm = 55℃ ~ 65℃。

（2）GC = 30% ~ 80%。

（3）PCR 扩增产物长度，引物的产物不要太大，一般在 80 ~ 300bp 都可。

（4）引物的退火温度要高，一般要在 60℃ 以上。

要特别注意避免引物二聚体和非特异性扩增的存在。而且引物设计时应该考虑到引物要有不受基因组 DNA 污染影响的能力，即引物应该跨外显子，最好是引物能跨外显子的接头区，这样可以更有效地不受基因组 DNA 污染的影响。做染料法最关键的就是寻找到合适的引物和做污染的预防工作，寻找合适的引物非常不易。

由于 RNA 纯化后得率不同、RNA 反转录为 cDNA 的效率不同等客观因素，用于定量分析的初始样品浓度不同，因此，在进行基因表达研究中都会用一些看家基因来标准化，以校正因样品初始浓度不同而造成的差异。常用的看家基因有 β - actin、GAPDH 等。

绝对定量通过标准曲线计算起始模板的拷贝数；相对定量方法则是比较经过处理的样品和未经处理的样品目标转录本，或是目标转录本在不同时相的表达差异之间的表达差异。在有些情况下，并不需要对转录本进行绝对定量，只需要给出相对基因表达差异即可。

2. Northern blot

Northern 印迹杂交（Northern blot）是一种将 RNA 从琼脂糖凝胶中转印到硝酸纤维素膜上的方法。继分析 DNA 的 Southern 杂交方法出现后，1977 年 Alwine 等人提出一种与此相类似的、用于分析细胞总 RNA 或含 poly A 尾的 RNA 样品中特定 mRNA 分子大小和丰度的分子杂交技术，这就是与 Southern 相对应而定名的 Northern 杂交技术。这一技术自出现以来，已得到广泛应用，成为分析 mRNA 最为常用的经典方法。

与 Southern 杂交相似，Northern 杂交也采用琼脂糖凝胶电泳，将分子量大小不同的 RNA 分离开来，随后将其原位转移至固相支持物（如尼龙膜、硝酸纤维膜等）上，再用放射性（或非放射性）标记的 DNA 或 RNA 探针，依据其同源性进行杂交，最后进行放射自显影（或化学显影），以目标 RNA 所在位置表示其分子量的大小，而其显影强度则可提示目标 RNA 在所测样品中的相对含量（即目标 RNA 的丰度）。但与 Soughern 杂交不同的是，总 RNA 不需要进行酶切，即是以各个 RNA 分子的形式存在，可直接应用于电泳；此外，由于碱性溶液可使 RNA 水解，因此不进行碱变性，而是采用甲醛等进行变性电泳。虽然 Northern 也可检测目标 mRNA 分子的大小，但更多的是用于检测目的基因在组织细胞中有无表达及表达的水平如何。

Northern blot 曾经是应用的最广的技术之一，尽管其分辨率和操作简易性都不如 PCR，但 Northern blot 依然是检测、定量 mRNA 大小及在组织中表达水平的标准方法，既是能直接提供有关 RNA 完整性、不同的剪接信息及 mRNA 大小等信息的唯一方法，也是在同一张膜上直接比较同一信息在不同样品中的表达丰度的首选方法。Northern blot 的操作步骤相当繁琐，且对 RNase 污染非常敏感，任何一步操作不当都会严重影响分辨率。尽管 Northern blot 曾经是应用得最广的技术之一，但不同的实验室甚至不同的人往往都会根据自己的条件采用不同的方法。通

常我们优化以下几个操作步骤可以使其灵敏度提高10~20倍：探针的选择、膜的选择和转移方法、杂交液的选择、甲醛还是乙二醛的选择、试剂的质量。

Northern blot 一般实验流程如下：

（1）经乙二醛和二甲基亚砜变性处理后进行的RNA电泳　这一方法源于McMaster和Carmichael。含有乙二醛-DMSO的凝胶比含有甲醛的凝胶更难于进行电泳，因为前者泳动速率较慢而且需将电泳液时行循环以避免电泳过程中形成过高的H^+梯度。尽管上述两种凝胶具有近乎相等的分辨率，但用含有乙二醛-DMSO的凝胶对RNA进行分级离，通常Northern杂交所显示的RNA条带更为锐利。

（2）将变性RNA转移至硝酸纤维素滤膜　电泳完毕后，可立即将乙醛酰RNA自琼脂糖凝胶转移至硝酸纤维素滤膜，有以下几种转移方法：毛细管洗脱法、真空转移法和电印迹法。毛细管洗脱法如下所述，真空转移法和印迹法则按有关仪器生产厂家产品说明书进行。

含甲醛的凝胶必须用经DEPC处理的水淋洗数次，除去甲醛。如果琼脂糖中浓度大于1%或凝胶厚度大于0.5cm或待分析的RNA大于2.5kb，需用0.05mol/L氢氧化钠浸泡凝胶20分钟。然后在凝胶上放置硝酸纤维素凝膜或尼龙膜，RNA随向上迁移的缓冲液转移至固相支持体（硝酸纤维素滤膜或尼龙膜）上。

（3）转移至硝酸纤维素滤膜前后进行的RNA染色　当RNA自琼糖凝胶转移至硝酸纤维素滤膜之前，溴化乙啶的染色时间一般不宜过长，这是因为被染料饱和的核酸分子，其转移效率有所降低。然而，用溴化乙啶做短暂染色，既不至于对核酸转移过程产生可以察觉的抑制，又独具同时检测凝胶和凝膜上的RNA的优点。

（4）杂交和放射自显影　固定于滤膜上的RNA的预杂交、杂胶及淋洗等条件，与DNA杂交的相应条件基本相同。膜于X线片曝光在低温延长时间效果会更好。

3. Western blot

Western blot 与上述Northern印迹杂交方法类似，但Western blot采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，

"显色"用标记的二抗。该技术广泛应用于检测蛋白水平的表达，经过PAGE分离的蛋白质样品，转移到固相载体（例如PVDF膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶标记的第二抗体起反应，经过底物显色或ECL显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。

Western blot首先是要将电泳后分离的蛋白从凝胶中转移到膜上，常用的电泳转移方法有湿转和半干转。两者的原理完全相同，只是用于固定胶/膜叠层和施加电场的机械装置不同。湿转是一种传统方法，这种方法是用有孔的塑料和有机玻璃板将凝胶和PVDF膜夹成"三明治"形状，而后浸入两个平行电极中间的缓冲液中进行电泳，选择适当的电泳方向就可以使蛋白质在电场力的作用下离开凝胶结合到膜上。这是一种有效方法，但比较慢，需要大体积缓冲液，且只能用一种缓冲液。半干转移，用浸透缓冲液的多层滤纸代替缓冲液槽。与湿转相比，这种方法要快（15～45分钟）。

转移后的PVDF膜就称为一个印迹（blot），用于对蛋白质的进一步检测。印迹首先用蛋白溶液（如10%的BSA或脱脂奶粉溶液）处理以封闭膜上剩余的疏水结合位点，而后用所要研究的蛋白质的抗体（一抗）处理，印迹中只有待研究的蛋白质与一抗特异结合形成抗原抗体复合物，而其他的蛋白质不能与一抗结合，这样清洗除去未结合的一抗后，印迹中只有待研究的蛋白质的位置上结合着一抗。处理过的印迹进一步用适当标记的二抗处理，二抗是指一抗的抗体，如一抗是从鼠中获得的，则二抗就是抗鼠IgG的抗体。处理后，带有标记的二抗与一抗结合形成抗体复合物可以指示一抗的位置，即是待研究的蛋白质的位置。目前有结合各种标记物的抗体特定IgG的抗体（二抗）可以直接购买，最常用的一种是酶连的二抗，印迹用酶连二抗处理后，再用适当的底物溶液处理，当酶催化底物生成有颜色的产物时，就会产生可见的区带，指示所要研究的蛋白质位置。在酶连抗体中使用的酶通常是碱性磷酸酶（AP）或辣根过氧化物酶（HRP）。碱性磷酸酶可以将无色的底物5－溴－4－氯吲哚磷酸盐（BCIP）转化为蓝色的产物；而辣根过氧化物酶

可以将 H_2O_2 为底物，将 3-氨基-9-乙基咔唑氧化成褐色产物或将 4-氯萘酚氧化成蓝色产物。另一种检测辣根过氧化物酶的方法是用增强化学发光法，辣根过氧化物酶在 H_2O_2 存在下，氧化化学发光物质鲁米诺并发光，通过将印迹放在照相底片上感光就可以检测出辣根过氧化物酶的存在，即目标蛋白质的存在了。

在 Western blot 实验中，有另一种方法，就是直接标记一抗，再用底物显色。这种方法叫直接法，与用二抗的间接法相比有诸多不足，标记二抗可用于很多种不同特异性的一抗，避免了标记很多一抗的需要，同时因为一抗结合不止一个二抗分子，所以二抗可以增强信号。所以一般情况下都采用间接法进行检测。

Western blot 要注意的一些问题如下：

（1）为了让实验更加严谨，有说服力，都要设计对照实验，最好有标准品（比如 β-actin、GAPDH）。

（2）一抗、二抗的浓度一般要参照抗体说明书选择最适当的比例，一抗、二抗的选择直接影响实验结果以及背景。

（3）实验设计时所采用的抗原批次要一样，尽量避免人为因素带来个体差异。特别在做裂解液时更要注意所采用的操作条件，尽可能的排除可变因素给实验带来不确定性。

（4）凝胶的质量直接影响以后的实验结果，要特别注意几点：凝胶要均一，没有气泡；积层胶与分离胶界面要水平；AP 和 TEMED 的量不能过多，太多会导致胶易脆裂；拔梳子时要快，尽量保证点样孔平整。

（5）电泳、转膜时特别要注意正负极，电压电流都不能过高；转膜时“三明治”的叠放次序不错，同时要防止产生气泡；尽量让电转温度保持在 10℃ 以下，冰浴为宜。

（6）封闭时一般在室温下 2 小时就够了，但是要注意如果是生物素标记的二抗就不宜用牛奶，因为牛奶中含有生物素，用 BSA 效果更好。

（7）加一抗二抗要严格保证反应时间，洗膜要注意尽可能地将一抗二抗洗净，有利于降低背景。

差异调控机制

1. **转录调控**

转录因子是一种具有特殊结构、行使调控基因表达功能的蛋白质分子，也称为反式作用因子。转录因子必须在核内作用，才能起到调控表达的目的。因此，转录因子上的核定位序列是其重要的组成部分。一般一个或多个核定位序列在转录因子中不规则分布，同时也存在不含核定位序列的转录因子，它们通过结合到其他转录因子上进入细胞核。核定位序列一般是转录因子中富含精氨酸和赖氨酸残基的区段。绝大多数转录因子结合 DNA 前需通过蛋白质 - 蛋白质相互作用形成二聚体或多聚体。所谓二聚体化就是指两分子单体通过一定的结构域结合成二聚体，它是转录因子结合 DNA 时最常见的形式。由同种分子形成的二聚体称同二聚体，异种分子间形成的二聚体称异二聚体。这种多聚体的形成是转录因子上的寡聚化位点（oligomerization site）相互作用的结果，寡聚化位点的氨基酸序列很保守，大多与 DNA 结合区相连并形成一定的空间构象。除二聚化或多聚化反应，还有一些调节蛋白不能直接结合 DNA，而是通过蛋白质 - 蛋白质相互作用间接结合 DNA，调节基因转录，这样就形成了一个表达调控的复合物。目前针对蛋白质与 DNA 的相互作用研究方法主要是体外方法凝胶迁移或电泳迁移率实验（EMSA）和体内方法染色质免疫沉淀技术（ChIP）。

（1）EMSA　该技术最初用于研究 DNA 结合蛋白，目前已用于研究 RNA 结合蛋白和特定的 RNA 序列的相互作用。通常将纯化的蛋白和细胞粗提液和 ^{32}P 同位素标记的 DNA 或 RNA 探针一同保温，在非变性的聚丙烯凝胶电泳上，分离复合物和非结合的探针。DNA - 复合物或 RNA - 复合物比非结合的探针移动得慢。同位素标记的探针依研究的结合蛋白的不同，可是双链或者是单链。当检测如转录调控因子一类的 DNA 结合蛋白，可用纯化蛋白，部分纯化蛋白，或核细胞抽提液。在检测 RNA 结合蛋白时，依据目的 RNA 结合蛋白的位置，可用纯化或部

分纯化的蛋白，也可用核或胞质细胞抽提液。竞争实验中采用含蛋白结合序列的 DNA 或 RNA 片段和寡核苷酸片段（特异），和其他非相关的片段（非特异），来确定 DNA 或 RNA 结合蛋白的特异性。在竞争的特异和非特异片段的存在下，依据复合物的特点和强度来确定特异结合。

凝胶迁移实验在理论上很简单也很快速，但要成功地进行凝胶迁移实验，需要优化一些参数，这主要受结合蛋白的来源和探针结合位点特点的影响。以下是需要优化的因素：抽提液的制备（核酸酶和磷酸酶污染会使探针降解）、结合蛋白的浓度，探针的浓度，非特异性探针的浓度、缓冲液的配方和 pH、聚丙烯凝胶电泳的特点和电泳条件、保温时间和温度、载体蛋白、是否有辅助因子（比如锌或镉等金属离子，或激素）等。总之，反应总体积应最小（20μl）。

对每一个特定的结合蛋白和探针，所用的纯化蛋白，部分纯化蛋白，粗制核抽提液需做优化，一般所用纯化蛋白的量在 20～2000ng，可将蛋白 DNA 的等摩尔比调整为蛋白的摩尔数是 DNA 的 5 倍。用粗制核抽提液，需要 1～20μg 蛋白形成特异的复合物。所加入反应的探针的量是 50 000～200 000cpm ^{32}P－标记的探针（高特异活性），反应体积为 1～5μl。这相当于 10～50fmoles 的 DNA 探针。探针应保存在 －20℃ 以防止降解，在合成或标记后 1～2 个星期内必需使用。无论探针或是结合蛋白应避免多次冻融。

另外，为避免假复合物的出现，一般在凝胶迁移反应中加入 poly（dI：dC）（dI：dC），可抑制粗制核抽提液中其他 DNA 结合蛋白结合，比如转录调节因子的非特异结合，结合溶液中的 poly（dI：dC）（dI：dC）的量需做优化，但一般用 0.05mg/ml。当用纯化的蛋白作凝胶迁移反应时，不必一定加入 poly（dI：dC）（dI：dC），如加入，则普通反应中所用终浓度不超过 50～100ng。对核抽提液，每 2～3μg 核抽提液用 1ug poly（dI：dC）（dI：dC）。

为确定所形成的复合物的特异性，在含或不含增量的非放射性的特异竞争 DNA 或非特异的竞争 DNA 时，作结合反应的竞争实验。一般非放射性的特异 DNA 是非标记的 DNA 探针，非特异的竞争 DNA ，长度组成和 DNA 探针相同，序列不同。用非放射性的特异 DNA 能竞争掉，

而用非特异的竞争 DNA 不能竞争掉的复合物，表明目的蛋白和同位素标记探针的特异结合。非特异结合能用特异 DNA 和非特异的竞争 DNA 竞争掉。非放射性的（特异或非特异）的竞争 DNA 的用量也需优化或滴定，但竞争 DNA 通常是同位素标记的探针的 10 ~ 1000 倍（w/w）。确定复合物中蛋白的特征可能会困难，但有一些方法做这方面的研究。如有目的蛋白的抗体，可进行超迁移实验，抗体和蛋白/探针复合物中的蛋白结合，使复合物的迁移延迟，形成超迁移。增量的抗体加入到结合反应中。抗体可加入到蛋白和探针反应后，也可将抽提物与抗体结合后，再加入探针。取决于抗体的特定的抗原决定簇，前者有利于超迁移复合物地形成，后者阻止复合物的形成导致原复合物的强度的减少。在大多数实验中，应对抗体作滴定，先使抗体:蛋白的摩尔比为 1:1，然后应需要增加抗体的量。当有纯化的蛋白时，可用它们和实验的带型迁移复合物比较。

（2）ChIP　ChIP 利用抗原抗体反应的特异性，可以真实地反映体内蛋白因子与基因组 DNA 结合的状况。特别是近年来由于该技术不断地发展和完善，其应用范围已经从研究目的蛋白与已知靶序列间的相互作用，发展到研究目的蛋白与整个基因组的未知序列的相互作用；从研究一个目的蛋白与 DNA 的相互作用，发展到研究两个蛋白与 DNA 共同结合的相互作用；从研究启动子区域的组蛋白的修饰，发展到研究结合在 DNA 序列上的蛋白复合物。随着对基因功能研究的不断深入，这项技术正越来越多地被应用于科研的各个领域。

染色质免疫沉淀技术的原理是在生理状态下把细胞内的 DNA 与蛋白质交联在一起，通过超声或酶处理将染色质切为小片段后，利用抗原抗体的特异性识别反应，将与目的蛋白相结合的 DNA 片段沉淀下来。染色质免疫沉淀技术一般包括细胞固定、染色质断裂、染色质免疫沉淀、交联反应的逆转、DNA 的纯化，以及 DNA 的鉴定。因为 ChIP 实验涉及的步骤多，结果的重复性较低，所以对 ChIP 实验过程的每一步都应设计相应的对照，而且对结果的分析也需要有一定的经验。对于刚刚开始使用 ChIP 技术的研究人员来说，使用成熟的商品化试剂盒和相关的技术服务会达到事半功倍的效果，比如 Millipore 公司的 EZ－ChIP

试剂盒就是专门为初学者设计的入门产品。下面我们就最基本的实验步骤，实验中的小技巧以及需要注意的问题简单介绍一下。

①细胞固定：甲醛能有效地使蛋白质－蛋白质、蛋白质－DNA、蛋白质－RNA交联，形成生物复合体，防止细胞内组分的重新分布。甲醛的交联反应是完全可逆的，便于在后续步骤中对DNA和蛋白质进行分析。交联所用的甲醛终浓度为1%，交联时间通常为5分钟到1个小时，具体时间根据实验而定。值得注意的是，交联时间如果过长，细胞染色质难以用超声波破碎，影响ChIP结果，而且实验材料也容易在离心过程中丢失。交联时间如果过短，则交联不完全，产生假阴性。甲醛的交联反应可被加入的甘氨酸终止。

②染色质断裂：交联后的染色质可被超声波或Micrococcal Nuclease切成400～600bp的片段（用琼脂糖凝胶电泳检测），以便暴露目标蛋白，利于抗体识别。超声波是使用机械力断裂染色质，容易引起升温或产生泡沫，这都会引起蛋白质变性，进而影响ChIP的效率。所以在超声波断裂染色质时，要在冰上进行，且要设计时断时续的超声程序，保证低温。另外，超声探头要尽量深入管中，但不接触管底或侧壁，以免产生泡沫。总超声时间也不要太长，以免蛋白降解。Micrococcal Nuclease可以将染色质切成一到几个核小体，比超声波处理的结果更精致，更均一。另外，酶反应的条件比较温和，对DNA和DNA－蛋白复合物的损伤较小，而且蛋白不易变性。酶处理染色质适用于新鲜的细胞或组织样品和冰冻样品。在研究组蛋白时，经常采用没经过甲醛固定的Native ChIP（N－ChIP）的研究方法。因为N－ChIP没经过甲醛固定，超声波处理会打断组蛋白和DNA的结合，所以只能选择酶处理染色质的方法。对于甲醛固定的样品，一般选择超声波处理方法。也有研究人员使用酶处理的方法研究甲醛固定较温和的样品。

③染色质免疫沉淀：Input对照，在进行免疫沉淀前，需要取一部分断裂后的染色质做Input对照。Input是断裂后的基因组DNA，需要与沉淀后的样品DNA一起经过逆转交联，DNA纯化，以及最后的PCR或其他方法检测。Input对照不仅可以验证染色质断裂的效果，还可以根据Input中的靶序列的含量以及染色质沉淀中的靶序列的含量，按照取

样比例换算出 ChIP 的效率，所以 Input 对照是 ChIP 实验必不可少的步骤。Beads 选择，接下来，利用目的蛋白质的特异抗体通过抗原 - 抗体反应形成 DNA - 蛋白质 - 抗体复合物，然后使用 Agarose beads 或 Magna beads 沉淀此复合物，特异性地富集与目的蛋白结合的 DNA 片段。再经过多次洗涤，除去非特异结合的染色质后，用 SDS + NaHCO3 洗脱免疫沉淀复合物。Magna beads 是近年来出现的一种新型 beads，它使用方便，不像 Agarose beads 那样容易破裂，所以在操作过程中更简单，而且免去了离心的步骤，节省不少时间。抗体选择，染色质免疫沉淀所选择的目的蛋白的抗体是 ChIP 实验成功的关键。因为在蛋白质与染色质交联结合时，抗体的抗原表位可能因为与结合位点的距离太近，不能被抗体识别，所以不能有效地在体内形成免疫沉淀复合物，直接影响 ChIP 的结果。所以不是所有的抗体都能做 ChIP 实验的，只有经过 ChIP 实验验证后的抗体才能确保实验结果的可靠性。阳性与阴性对照，在做 ChIP 实验时，一定要做好实验对照，因为没有对照，很难对实验结果的可靠性进行评估。阳性抗体和阴性抗体对照是最基本的实验对照。阳性抗体通常选择与已知序列相结合的比较保守的蛋白的抗体，常用的包括组蛋白抗体或 RNA Polymerase Ⅱ 抗体等。阴性抗体通常选择目的蛋白抗体宿主的 IgG 或血清。目的蛋白抗体的结果与阳性抗体和阴性抗体的结果相比较，才能得出正确结论。另外，还应考虑目的蛋白抗体与 DNA 的非特异性结合的可能，所以通常还会选择一对阴性引物，即目的蛋白肯定不会结合的 DNA 序列，作为该抗体的阴性对照。最佳的阴性对照引物是在靶序列上游的一段与目的蛋白肯定不能结合的序列。如果目的蛋白没有商品化的适用于染色质免疫沉淀实验的抗体，只有其他用途的抗体时，可以先做蛋白质免疫沉淀（immunoprecipitation）检测。如果抗体可以成功的沉淀蛋白，再进行染色质免疫沉淀实验的检测。

④交联反应的逆转和 DNA 的纯化：用不含 DNase 的 RNase 和 Proteinase K，65℃保温 6 小时逆转交联，经 DNA 纯化柱回收 DNA 或用酚氯仿抽提、乙醇沉淀纯化 DNA。DNA 纯化柱纯化 DNA 的质量高，有利于下一步 PCR 等方法的检测。因为甲醛不仅交联 DNA - 蛋白质，还交联蛋白质 - 蛋白质，所以还可以对 DNA 序列上的蛋白质复合物进行分

析。在逆转交联时不使用 Proteinase K，然后用丙酮回收有机相中的蛋白质，进行分析。

⑤DNA 的鉴定：最常用的 DNA 的鉴定方法是半定量 PCR 和 Real - time PCR。由于启动子区域的序列具有多样性的特点，所以不同的细胞系或不同的动物品系的同一基因的启动子序列有可能不同。而且启动子区域多富含 CG 的序列，其 PCR 条件可能需要相应调整。有条件可设计不止一对引物来反复验证 ChIP 实验的结果。

⑥ChIP 技术的应用：染色质免疫沉淀的 DNA 适用于多种分析方法。如果目的蛋白的靶序列是已知的或需要验证的，可采用狭缝杂交（Slot blot）的方法，把靶序列特异性探针与染色质免疫沉淀的 DNA 杂交，来验证目的蛋白与 DNA 靶序列的特异性结合。还可以根据靶序列设计引物，用半定量 PCR 的方法进行测定，或采用 Real - time PCR 方法进行定量分析。如果目的蛋白的靶序列是未知的或高通量的（high - throughput），可采用 Southern 杂交。但因为免疫沉淀的 DNA 量较少，所以在研究时通常要用 PCR 方法扩增 DNA 探针，再进行整个基因组扫描。还可以把沉淀的 DNA 克隆到载体中，进行测序，寻找该序列附近的开放阅读框，发现新的基因调节序列。

目前，随着人类基因组测序工作的基本完成，研究目的蛋白和整个基因组的相互作用逐渐成为研究的热点。由于基因组中的信息量非常大，上述常规方法通常无法满足科研的需要。近年来发展起来的ChIP - chip 技术将基因组 DNA 芯片（chip）技术与染色质免疫沉淀技术（ChIP）相结合，为研究目的蛋白与整个基因组相互作用提供了可能。ChIP - chip 技术通过标记染色质免疫沉淀富集的 DNA 片段，和另一个被标记不同探针的对照组样品一起，与 DNA 芯片杂交，再利用各种生物信息学方法对收集到的信号进行分析。染色质免疫沉淀技术还可用于分析两种蛋白共同结合的 DNA 序列，即 ChIP reChIP 方法。ChIP reChIP 是在第一次 ChIP 的基础上不解交联，而继续进行另一个目的蛋白的免疫沉淀，从而得到与两种目的蛋白都结合的 DNA 序列。值得注意的是，因为通过两次免疫沉淀富集的 DNA 量比较少，所以在分析时通常要把多次免疫沉淀的 DNA 浓缩后再进行操作。

随着染色质免疫沉淀技术受到广泛的关注，运用该技术发表的文章也逐渐增多，大家越来越多的开始关注如何改进 ChIP 的方法。Millipore 最新推出的 Magna ChIP 试剂盒，利用磁珠分离 DNA-蛋白-抗体复合物，提高了 ChIP 的效率，简化了操作的过程，缩短了实验的时间，还为同时进行多个目的蛋白的研究提供了可能，是经常使用 ChIP 技术的研究人员的理想选择。

近年来 ChIP 技术也被用于研究 RNA-蛋白的相互作用，其原理与 DNA 类似，也包括甲醛固定、超声波破细胞、免疫沉淀、交联逆转、RNA 纯化和 RNA 鉴定等步骤。所不同的是，交联逆转只用 Proteinase K，要进行 RNA 纯化和不含 RNase 的 DNase 处理，分析时用 RT-PCR，芯片杂交要用 cDNA 芯片等。

（3）启动子功能性分析　顺式作用元件是转录调节因子的结合位点，包括启动子、增强子和沉默子。它们通过与转录因子结合而调控基因转录的精确起始和转录效率。启动子是 DNA 分子可以与 RNA 聚合酶特异结合的部位，也就是使转录开始的部位。在基因表达的调控中，转录的起始是个关键。常常某个基因是否应当表达决定于在特定的启动子起始过程。通常可以通过生物信息学方法对基因的启动子进行预测，然后结合报告基因分析启动子活性验证。

对基因启动子的瞬时转染分析研究必须经过下列步骤：①确定需要转染的细胞系；②鉴定目的基因的假定启动子区域；③选择报告基因和相应的报告基因分析方法；④将启动子插入到合适载体的报告基因上游；⑤选择合适的转染方法。

用于瞬时转染分析的细胞必须具备以下条件：①细胞应表达含有目的启动子的内源基因；②必须具备将质粒 DNA 转染人细胞的方法；③能使培养物中的细胞在 2~3 天保持数目恒定，以确保实验的完成。

基因组克隆分离启动子通常是以全长 cDNA 的 5′末端为探针筛选基因组文库。从基因组中分离启动子区域后，确定转录起始位点，对起始位点周围序列测序并开展功能性分析，以鉴定相关的调控元件。对真核基因调控的了解，主要来自野生型和突变型的假定顺式作用调控元件的活性测定实验，这些实验是在转染的真核细胞中进行的。在大多数情况下不直接测

定调控元件的调节转录速率的能力，而是把顺式调控元件与报告基因（reporter gene）的基因序列连接起来，在基因的转录过程中，测定细胞内报告蛋白的含量或活性，来判断顺式调控元件的调控能力。虽然这是一个间接的方法，但却是一种可行、有时是唯一的方法。

要分析启动子的活性，就要将假定的启动子序列插入到报告基因的上游。插入报告基因的 DNA 片段，必须首先确定翻译起始密码子和转录起始位点的位置。一般来讲，研究启动子片段下游的界限应选在转录起始位点和 ATG 之间。插入报告载体启动子片段的上游界限很难确定，可以参考相关文献的报道，因为特定家族的基因间可能存在相似机制。如果目的调控区是一个启动子，且置于紧靠报告基因的上游，则这种启动子就能驱动报告基因的转录。如果目的调控区是在启动子的远距离处起作用的增强子或其他调控区，通常将分析较透彻的启动子插到报告基因的上游，将增强子插到启动子的上游或报告基因的下游。下游位置通常是首选的，因为在启动子的邻近部位安置一个增强子会改变其特性，使某个元件和附近的启动子元件发生异常协同作用。

目前有很多功能性分析方法用于研究转录调控，最常用的方法是瞬时转染分析法。该方法是通过一定的转染程序将含目的调控区的质粒导入培养细胞。在典型情况下，调控区调控“报告基因”的转录。报告基因是在 mRNA 和蛋白质的水平上都易于被正确检测到的基因。产生的质粒在培养细胞中转录后，在特定时刻测定从报告基因上合成的 mRNA 或蛋白质，以评价调控区的活性。人们将这种分析方法称为瞬时转染分析，因为此时质粒仍然以附加的形式存在，很少整合进宿主基因组。因此，mRNA 或蛋白质产物必须在短时间内（1 ~ 3 天）进行测定，否则随着细胞的生长和分裂，质粒会被降解或稀释。虽然瞬时转染分析法具有多种局限性，但该方法仍然常用于对顺式作用 DNA 序列和调控基因表达的反式因子进行初步分析。

瞬时转染分析法快捷、简单，易于对结果定量，因此成为启动子功能分析的首选方法。瞬时转染分析法也有两个主要局限性：首先在被转染的细胞中，质粒的人工构象和拷贝数可能会导致特异性调控元件失活或具有特异功能；其次，瞬时转染分析法不能用于检测那些需诱导或分

化时间超过 72 小时时间期限的研究。

对在瞬时转染分析中未表现出预期活性的调控区，或依赖于特异染色质结构的调控区，可以采用稳定转染分析法，即将含有报告基因的目的基因调控质粒稳定地整合进基因组。此外，还需将由组成型启动子控制的抗药性基因（如显性选择标记基因）稳定地整合进基因组进行分析。抗药性基因可以和报告基因在同一个质粒上，也可以在不同质粒上。将含有报告基因和抗药性基因的质粒转染培养细胞，培养基中加入能杀死不稳定表达抗药性基因细胞的药物，部分质粒被稳定地整合到染色体上。多数情况下，在细胞中多个质粒分子彼此相连形成多联体，多联体随机整合到多联体基因组中，因此每个被稳定转染的细胞都具有独特的整合位点。然后通过测定被稳定转染细胞中报道基因的活性，来确定目的调控区的活性。

稳定转染分析方法的主要优点是，进行分析的调控区及报道基因通常位于近乎天然的染色质构象中，具有近乎天然的拷贝数，这些特点使调控区能更精确地模拟正常功能。在稳定转染分析中，因对转染的细胞进行了选择性扩增，所以克服子瞬转细胞吸收 DNA 少的缺点。稳定转染分析的另一个特点是对随后的转录分析没有时间限制。因此，稳定转染对所需时间相对较长的研究非常有用。稳定转染分析的缺点是因为要进行药物筛选和细胞扩增，因此操作难度较大，需要的时间较长。

2. miRNA 调控

microRNA（miRNA）是一种小的，类似于 siRNA 的分子，由高等真核生物基因组编码，miRNA 通过和靶基因 mRNA 碱基配对引导沉默复合体（RISC）降解 mRNA 或阻碍其翻译。miRNA 在物种进化中相当保守，在植物、动物和真菌中发现的 miRNA 只在特定的组织和发育阶段表达，miRNA 组织特异性和时序性，决定组织和细胞的功能特异性，表明 miRNA 在细胞生长和发育过程的调节过程中起多种作用。

miRNA 基因通常是在核内由 RNA 聚合酶Ⅱ（poⅢ）转录的，最初产物为大的具有帽子结构（7MGpppG）和多聚腺苷酸尾巴（AAAAA）的 pre－miRNA。pre－miRNA 在核酸酶 Drosha 和其辅助因子 Pasha 的作

用下被处理成70个核苷酸组成的pre-miRNA。RAN-GTP和exportin 5将pre-miRNA输送到细胞质中。随后，另一个核酸酶Dicer将其剪切产生约为22个核苷酸长度的miRNA：miRNA*双链。这种双链很快被引导进入沉默复合体（RISC）复合体中，其中一条成熟的单链miRNA保留在这一复合体中。成熟的miRNA结合到与其互补的mRNA的位点通过碱基配对调控基因表达。

与靶mRNA不完全互补的miRNA在蛋白质翻译水平上抑制其表达(哺乳动物中比较普遍)。然而，最近也有证据表明，这些miRNA也有可能影响mRNA的稳定性。使用这种机制的miRNA结合位点通常在mRNA的3'端非翻译区。如果miRNA与靶位点完全互补（或者几乎完全互补)，那么这些miRNA的结合往往引起靶mRNA的降解（在植物中比较常见)。通过这种机制作用的miRNAs的结合位点通常都在mRNA的编码区或开放阅读框中。每个miRNA可以有多个靶基因，而几个miRNAs也可以调节同一个基因。这种复杂的调节网络既可以通过一个miRNA来调控多个基因的表达，也可以通过几个miRNAs的组合来精细调控某个基因的表达。随着miRNA调控基因表达的研究的逐步深入，将帮助我们理解高等真核生物的基因组的复杂性和复杂的基因表达调控网络。

miRNA研究的方法技术主要可概括为两类，即生物信息学方法和实验生物学方法。对目的miRNA全面系统的生物信息学分析，能为miRNA的功能研究提供重要线索，从而帮助研究者更好地进行目的RNA的相关功能与机制研究。一般通过芯片或测序得到差异的miRNA后，需要进入miRNA数据库miRBase获得序列对其进行分析，并通过软件对其靶基因预测。常用的靶基因软件有Targetscan、Pictar和miRanda等。

寻找miRNA调控的靶基因，并以此为线索研究miRNA在某一特定生理或病理条件下的作用是阐述miRNA功能所必需的。当研究者通过软件筛选可能的靶基因后需要克隆其调控位点，之后用报告基于分析系统进行验证分析。pMIR-REPORT miRNA Expression Reporter Vector可

在细胞内准确、定量地测量 miRNA 的表达。这个已经验证的报告系统包含两个哺乳动物表达载体。pMIR - REPORT 包含一个受哺乳动物启动子/终止子系统控制的荧光素酶，在荧光素酶基因序列下游带有一个 miRNA 靶标（miRNA 结合区域）的克隆位点。这个载体特别为克隆 miRNAs 靶点从而评估 miRNA 调控水平而设计。第二个载体，pMIR - REPORT Beta - gal Control Vector，可用于平衡转染效率。pMIR - REPORT miRNA Expression Reporter Vector 用于克隆和验证潜在的 miRNA 结合位点。pMIR - REPORT 转染哺乳动物细胞，可用于评估内源 miRNA 表达，也用于评估 Pre - miRmiRNA Molecules 和 Anti - miR miRNA Inhibitor Molecules 的上调或下调。pMIR - REPORT miRNA Expression ReporterVector 还可作为一个序列筛选工具来鉴定 miRNA 靶点，或筛选 Pre - miR miRNA Molecules 文库从而鉴别能调节表达的基因。

通过 miRNA mimics 和 inhibitors 从功能上进行实验鉴定。另外序列分析表明，至少有 1/3 的人类基因与 miRNA 调控相关，而且越来越多的试验证据表明 miRNA 还有很多功能未被发现。研究基因的功能通常是将其从基因组中敲除，然后观察敲除前后的变化，但在破译 miRNA 的功能，我们一般不会采用这种策略，而是通过增强或减弱该 miRNA 的表达来鉴定其功能。

miRNA mimics 是模拟生物体内源的 miRNAs，运用化学合成的方法合成的 miRNA 分子，用于上调细胞中的特定 miRNA 水平，能增强内源性 miRNA 的功能，设计用于模拟细胞内的 miRNA 分子。miRNA mimics 可直接进入 miRNA 加工途径，与细胞内的内源 miRNA 分子一样。能调控特定 miRNA 活性，严谨调控细胞内 miRNA 水平，以最小细胞毒性，实现最佳的导入效率。合成的 miRNA 要真正发挥作用，一定要有活性、耐受性强，最重要的，是要有适合的双链构型。正如 Schwarz et al. 所指出，如 siRNA 和 miRNA 一类的双链小分子 RNA 呈现的链型中，两条互补 RNA 分子中仅有一条 RNA 会优先进入 miRNA（或 siRNA）通路。小分子 RNA 的序列组成和双链稳定性决定了哪一条会在细胞中有活性。转染的 miRNA 应模拟同样的链型以确保活性 miRNA 链的有效进入 miR-

NA通路，不正确的互补链被排除在外。由于miRNA mimics直接进入miRNA信号通路，可避免siRNA类设计会出现的非miRNA细胞应答。与质粒表达miRNA不同，miRNA mimics很容易转染，胞内应激反应极小，适用于通过严谨的剂量调控进行特定的剂量反应分析。

miRNA inhibitor是化学修饰的专门针对细胞中特异的靶miRNA的抑制剂。使用化学合成的方法合成miRNA inhibitors，特异的靶向和敲除单个的miRNA分子，可以削弱内源miRNA的基因沉默效应，提高蛋白表达量，进行功能缺失性（loss - of - function）研究，可以用来筛选miRNA靶位点，筛选调控某一基因表达的miRNA，筛选影响细胞发育过程的miRNA。另外对于小鼠中的miRNA研究，科学家们开发出一些遗传方法，来产生功能丧失的突变。目前主要有三种：①Dicer酶的突变，让所有成熟的miRNA都缺失；②小鼠中miRNA基因的敲除；③miRNA靶位点的突变。不过，miRNA的高度冗余让这种功能丧失研究面临不小的挑战。而且，许多miRNA是成簇排列的，一个miRNA的缺失或干扰可能会影响多顺反子转录本的正确折叠和加工，从而影响相邻miRNA的表达。

化学合成miRNA mimics和inhibitors是近年来研究的一个新热点，miRNA的过表达和沉默，则是一种有力的方法来研究miRNA的功能。这些研究应当在细胞内或体内进行，并与表型和基因表达分析相结合。上述方法提供了miRNA体外和体内功能研究的框架，在发育或分化的不同阶段以及疾病模型中，miRNA已经成为研究基因家族功能的有用工具，并有望成为癌症治疗和临床研究的一种新策略。

缺失性功能研究

1. 基因敲除

基因敲除（gene knockout），是指对一个结构已知但功能未知的基因，从分子水平上设计实验，将该基因去除，或用其他序列相近基因取

代，然后从整体观察实验动物，推测该基因相应功能的方法。这与早期生理学研究中常用的“切除部分——观察整体——推测功能”的三部曲思想相似。基因敲除不仅可中止某一基因的表达，还包括引入新基因及引入定点突变。既可以是用突变基因或其他基因敲除相应的正常基因，也可以用正常基因敲除相应的突变基因。

基因敲除是20世纪80年代后半期应用DNA同源重组原理发展起来的一门新技术。80年代初，胚胎干细胞（embrymic stem cell，简称ES细胞）分离和体外培养的成功奠定了基因敲除的技术基础。1985年，哺乳动物细胞中同源重组存在的首次证实奠定了基因敲除的理论基础。到1987年，Thompsson建立了完整的ES细胞基因敲除的小鼠模型。此后的几年中，基因敲除技术得到了进一步的发展和完善。

基因敲除小鼠的出现至少是四种技术发展和综合应用的结果：一是ES细胞的成功分离，并证实这种细胞仍能重新参与处于胚泡阶段的胚胎发育；二是在哺乳动物细胞中，外源DNA可与内源基因组DNA中的同源区域发生重组（这种重组现象可称之为定点整合，或基因打靶）的发现；三是证实存在于ES细胞中的突变基因可以引入活体动物，并通过生殖系向后代传递；四是正负选择系统的应用，使小鼠ES细胞中内源基因的定点突变在技术上变得可行。

（1）基因敲除小鼠的制备　基因敲除的靶细胞目前最常用的是小鼠ES细胞。基因敲除的技术路线虽不复杂，但由于高等真核细胞内外源DNA与靶细胞DNA序列自然发生同源重组的几率非常低（约为百万分之一），所以要筛选出基因敲除成功的细胞非常困难。因此，同源重组的筛选和检测就成了基因敲除技术所要解决的关键问题。目前已有多种筛选方法，如正向选择法、正负双向选择法和PCR法等，其中1988年Utah大学的Capecchi教授的研究组设计了一套正负双向选择（positive－negative selection，PNS）系统，可适用于几乎所有基因的选择。因此，以PNS系统来介绍基因敲除的技术路线。

①构建重组基因载体：该载体中应含有一段与内源目的基因（target gene，以“A”代表）同源的顺序（10～15kD），且该同源顺序内的一个外显子中插有新霉素抗性基因（neor），以用作正选择的标志；而

在同源顺序3′端的载体顺序中还插有疱疹病毒胸苷激酶（HSV－tk）基因的顺序，以作为负选择标记。虽然HSV－tk基因本身没有启动子，但它很靠近靶基因同源顺序的3′端，因而位于同源顺序中的neor基因的启动子可以对它起调节作用。

②DNA导入：以一定的方法（显微注射、磷酸钙共沉淀、电穿孔或逆转录病毒介导等方法）将所构建的载体DNA导入胚胎干细胞，继续培养。

③用选择性培养基筛选已击中的细胞：用药物新霉素（G418）和更昔洛韦（gancyclovir，简称：GANC）作双重选择，如果所导入的载体DNA与受体基因组DNA之间发生的是同源随机整合，则外源DNA以从头到尾顺序整合入受体DNA中，故其基因型就应为A*、neor、HSV－tk。此时neor基因和HSV－tk基因同时表达，neor基因的产物具有G418抗性，但HSV－tk基因的产物可使GANC转变为一种有毒物质，使细胞死亡。因而当发生非同源性重组时受体细胞不能存活。然而如果发生的是同源重组，外源性的neor基因便可一并整合到受体细胞的靶基因A的座位上，而位于其3′端包含有HSV－tk基因的非同源的载体顺序就丢失了。此时，仅有neor基因表达，其产物可使受体细胞具有G418抗性而存活下来。由此可见，通过PNS的选择后，所存活下来得细胞都是发生了同源重组的细胞，也就是希望得到的、定点整合的细胞。以上几个方面的发展构成了对小鼠基因重组中特定基因进行人为破坏的技术体系。

④检测分析：将击中的细胞转入小鼠胚胎中，使其生长成为转基因小鼠，对转基因小鼠进行形态学观察及分子生物学检测。将通过筛选得到的同源重组的小鼠ES细胞在体外扩增，并注射到宿主胚泡中，再将胚胎植入假孕母体子宫内，使其发育成目的基因缺陷（突变）的杂合的种系嵌合体，将其自交后再筛选出目的基因缺陷型的纯合子即基因敲除小鼠。通过分析基因敲除小鼠体内单基因缺陷所产生的表型异常来研究基因调控和功能，建立疾病的动物模型以及进行基因治疗等。

2. **直接型与诱导型基因敲除**

（1）直接型（也叫组成型）基因敲除　将目的基因在培养的 ES 细胞中直接去除或破坏，再将这种 ES 细胞植入早期胚胎的胚泡腔内，以得到嵌合体小鼠。然后采用经典遗传学方法筛选生殖系统是由所植入的 ES 细胞发育而来的个体，进而培育出遗传上稳定的小鼠品系。然而，此方法的最大问题是存在致死效应，即当所敲除的基因在生长发育中起重要作用时，常使胚胎致死。

（2）诱导型基因敲除　目的基因的敲除事件发生在诱导处理之后，而且可以人为地控制在发育过程中的某特定阶段和特定的组织细胞内。大致的过程是：利用同源重组原理在 ES 细胞中的目的基因（可以是整个基因，也可以是基因中的一部分）的两侧各插入一个 loxP 位点（为很短的一段核苷酸顺序，在重组酶 Cre 的催化下 loxP 位点之间可发生同源重组，故可导致目的基因的缺失），再将这种工程化 ES 细胞移植入早期胚胎的胚泡腔内，使其参与胚胎的生长发育，以得到遗传学上稳定的、目的基因的两侧带有 loxP 位点的小鼠品系。然后将这种小鼠个体与带有 Cre 基因的转基因小鼠（其 Cre 基因可被诱导性的启动子或组织特异性表达的启动子所控制），进行交配，便可得到目的基因的两侧含有 loxP 位点、同时也含有 Cre 基因的小鼠个体，再进一步适时地将此类小鼠作诱导处理，便可实现目的基因定时、定位的缺失。这种做法的最大优点是能够有效地克服致死效应。通过基因敲除，可以得到具有特定基因缺陷的小鼠品系，以用作医药研究的动物模型。也可以观察到当所研究基因的表达产物（蛋白质）缺少时对小鼠的生长发育和生理现象的影响，即能够从“反面”认识基因的功能。

3. **基因敲除主要应用领域**

随着通过 ES 细胞基因敲除途径建立转基因小鼠技术的成熟，首次使体外精细的基因操作与小鼠的整个生长发育和生命过程直接结合，为探讨高等动物基因组结构和功能提供了有效的方法。基因敲除小鼠模型的建立为哺乳动物正常生物学研究提供一有利工具，该模型对发育生物学、肿瘤学、免疫学、神经生物学和人类遗传学等产生了深远的影响。理论上，基因敲除可适用于任何能产生 ES 细胞的物种，将来可在小鼠

基因敲除成熟的基础上开展其他实验动物的基因敲除工作。基因敲除的应用领域目前主要有以下几个方面：

（1）建立人类疾病的转基因小鼠模型　基因敲除小鼠是研究疾病的发生机制、分子基础及诊断治疗的重要实验模型。如1989年囊性纤维化病（CF）的致病基因（CFTR）被成功地克隆，1992年成功建立了敲除CFTR基因的CF小鼠模型，为CF基因治疗提供了很好的动物模型，得以顺利通过了基因治疗的动物试验，于1993年开始临床试验并获得成功。随后，基因敲除小鼠模型在生命科学的各个领域、各个学科都已得到广泛的应用。

（2）改造动物基因型、鉴定新基因和（或）其新功能　人类和动物的基因数目成千上万，对于人类来说，绝大多数基因的作用和表型仍是谜题。而深入研究基因敲除小鼠在胚胎发育及生命各期的表现，可以得到有关该基因在生长发育中详细的作用，为研究基因的功能和生物效应提供模式。目前人类基因组研究多由新基因序列的筛选检测入手，进而用基因敲除法在小鼠上观察该基因缺失引起的表型变化。如Plum和Zhang等分别在各自的实验室里，用基因敲除方法获得同样的结果：ApoE蛋白具有抵制动脉硬化的作用。Shull等培育的转化生长因子β1（TGFβ1）敲除小鼠，其纯合子直到成年也没有表现出炎症反应，而MHCⅡ抗原和ICAM－1水平正常，证明TGFβ1在调节淋巴细胞的增生和活化方面起重要作用，对维持自身的耐受性也很重要。

（3）基因敲除小鼠模型在免疫学中的应用　近年来，随着基因敲除小鼠模型的出现，在免疫学方面出现了几十种免疫分子基因被敲除的动物模型，将免疫学研究特别是免疫耐受的研究推到一个新的阶段。例如：TCR基因敲除后，小鼠胸腺发育不全，脾中的B细胞增多；免疫球蛋白u链基因敲除后，B细胞发育受阻；MHCⅠ和Ⅱ类抗原基因敲除后，小鼠缺乏$CD4^+$、$CD8^+$型T细胞；RAG重组酶基因被敲除后，出现免疫球蛋白重排障碍等。Gu等成功地将鼠k轻链恒定区Ck基因敲除，并用人的Ck基因片段取代，在纯合体中，B淋巴细胞产生了含有人Ck的抗体分子，具有抗体的反应性，产生了“拟人化”的抗体，有着巨大的潜在社会效益。

（4）基因敲除小鼠在药物依赖性研究中的应用　近年来基因敲除小鼠在药物依赖性研究中也得到了广泛的应用。在传统的药物依赖性研究中，往往选取特异性的受体配体来研究该受体在依赖性中的作用，但这种特异性往往是相对的，剂量改变就可能影响其他受体的功能，所以难以真正确定该受体的作用。而基因敲除技术在这方面具有独特的优点，因为利用基因敲除技术可以选择性地敲除某一特定受体基因，获得先天缺陷该受体基因的小鼠，通过比较基因缺失动物和野生性动物在依赖性模型上的行为差别，可以准确判断该受体所发挥的作用。可以说，基因敲除技术的发展为药物依赖性研究带来了一场新的革命。目前已有学者利用基因敲除技术培育出 μ、κ 和 σ 阿片受体基因缺陷小鼠，还有实验室敲除了多巴胺受体或多巴胺递质转运体基因、组织纤维蛋白酶原激活因子基因等，为研究它们在药物依赖性中的作用提供了很好的实验模型。

（5）改造生物、培育新的生物品种　细菌的基因工程技术是本世纪分子生物学史上的一个重大突破，而基因敲除技术则可能是遗传工程中的另一重大飞跃。这项新技术在基础理论研究及实际应用中都将有着广阔的应用前景。

基因敲除技术在国外已是成熟技术，而在国内才刚刚开始。但是，国内已有几家单位在这一领域开展了一些工作。例如，利用基因敲除系统，军事医学科学院杨晓研究了 Smad3 基因的功能；上海生化所李亦平成功地鉴定了 3 个与骨骼发育有关的新基因；安徽中医学院蔡钦朝等探讨了肿瘤坏死因子受体Ⅱ在郎格罕细胞迁移中的作用；南京大学张春妮等研究了极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白与动脉硬化的关系；第二军医大学戴旭明等将小鼠胚胎干细胞中凝血因子Ⅸ（mFⅨ）基因定向敲除，为建立血友病 B 的转基因小鼠模型奠定了基础。1997 年 12 月，中国科学院上海细胞生物研究所胡赓熙博士率领的研究小组开始研究小鼠基因剔除技术，目标“锁定”了一个肝素合成酶基因。在攻克基因染色体 DNA 克隆、细胞株构建等难关后，历经 1 年多时间，于 1999 年 4 月 28 日，他们利用肝素合成酶基因剔除后的细胞培育出第一个完整的小鼠，也因此在世界上率先建立了由遗传因素引起的新生儿呼吸窘迫综合征的动物模型，为人类进一步研究遗传性疾病提供了理想参照物。

而且，中国医学科学院实验动物研究所基因敲除中心经过筹备，已于2001年3月21日正式成立，并聘请在基因敲除领域研究中具有国际一流水平的科学家——美国哈佛大学医学院副教授李亦平博士担任中心主任。这将对我国人类基因组（特别是功能基因组和蛋白组）研究，小鼠基因资源基因库的建立，疾病动物模型和疾病发生发展机制及防治研究，以及相关产业的形成产生积极的促进作用。

4. 问题和展望

基因敲除技术允许人们极为精确地操作单个基因，遗传改变非常清楚，可以研究以前无法了解的基因表型效应，在基因研究方面无疑是一个重要的里程碑。但这一技术也带来了一些难以预见的问题。近年来人们争论的焦点是，基因敲除模型的表型是否是由突变的靶基因造成的。Gerlai指出，目前基因敲除的结果忽略了背景基因的作用，由于敲除基因的缺失，机体可能产生一种雪崩式的代偿过程，引起基因的第二次改变；因此有理由相信一个复杂的表型改变与某一特定的基因不是完全的因果关系。Kim和Tanimoto等在各自的实验室里敲除小鼠的高血压蛋白原基因（AGT），由于各自的遗传背景不同，所产生的表型不一样，Tanimoto等得到的结果是AGT敲除对血压无影响，而Kim等得到的结果正好相反。Lathe指出除基因背景外，还有其他许多因素使基因敲除结果复杂化，大部分研究将表型的变化归结为基因功能的丢失，这个说法是不准确的。

基因敲除小鼠模型的建立，为哺乳动物正常生物学研究提供一个很有力的手段。尤其是人类基因测序工作已完成，人类将进入后基因组时代，即研究人类功能基因各自的作用和表型。基因敲除动物模型的建立为这项浩繁的工程提供一种很好的方法。随着这项技术的应用和发展，今后将主要会围绕下列问题进行讨论：①如何增加打靶效率；②进一步发展可诱导型的组织特异性打靶效应；③选择不同的靶基因，从疾病模型的建立到基因治疗，从药物生产到改良动植物的品种等方面进行实践；④如何消除背景的影响效应。对这一问题现已提出许多方法：较经典的方法是利用回交以降低背景基因发挥作用的可能性；另一种方法是导入蛋白，恢复丢失的功能，如果突变动物模型转为正常，说明表型的

改变与基因敲除有关；还有一种最简便的解决方法是避免同时使用背景不同的小鼠。随着21世纪这一生物世纪的到来，基因敲除动物模型建立技术将会更完善，用途会更广泛。

RNA 干扰

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是一种典型的转录后基因表达调控方式，是生物进化中的一种保守行为，具有抵抗病毒入侵和维持基因组稳定性的作用。RNAi 技术为反向遗传学、发育生物学和功能基因组研究提供了一个有力的武器。

1. 生物学意义与机制

病毒等外源核酸和基因组内的转座因子能破坏宿主细胞基因组的稳定性。转录后基因沉默，就是宿主将这些核酸视为对自身有害的序列而抑制其表达，这种抑制作用具有序列特异性特点，是生物在进化过程中形成的一种维护自身基因组稳定性的防御手段。RNAi 主要发生在胞浆中，部分发生在细胞核中。RNAi 现象的机制还没有完全弄清楚，涉及很多不明功能的酶和蛋白质，其中最重要的是双链 RNA（dsRNA）特异性核酸内切酶（dsRNA specific endonuclease，Dicer）。Dicer 是 RNAi 作用的关键成分，具有解旋酶活性、dsRNA 结合域和 PAZ 结构域，属于核糖核酸酶Ⅲ（ribonuclease Ⅲ）超家族的一员，进化上非常保守，能特异性切割 dsRNA，产生小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）；si2RNA 是 RNAi 作用的重要中介分子。目前，对 RNAi 现象较一致的看法是：dsRNA 在 Dicer 的作用下，裂解成 3′端带有 2 个游离核苷酸的 21～23nts 的 siRNA，siRNA 与 RNA 诱导的基因沉默复合体（RNA2induced silencing complex，RISC）结合。RISC 含有核酸内切酶、核酸外切酶、解旋酶活性。在 ATP 参与下，RISC 内的 siRNA 解链成单链，反义 RNA 引导 RISC 寻找互补的 mRNA。这一过程是高度特异的，在核酸内切酶的作用下，mRNA 被降解，起到特异的抑制基因表达的效果。在不同的生物中，RNAi 现象具有不同的机制，表现的行为也不一

样。在线虫、植物和某些真菌中，RNAi 现象需要 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RNA dependent RNA polymerase，RDRP）参与。RDRP 以 siRNA 为引物，目标 mRNA 为模板，合成互补 RNA 链，产生新的 dsRNA。在 Dicer 作用下，dsRNA 被特异性切割，产生新的 siRNA 参与诱导 RNAi 反应，因而 RNAi 的效果具有放大作用，能较长时间抑制基因表达；但在哺乳动物细胞中没有 RDRP 的参与，故没有放大作用，在内源性核糖核酸酶作用下，对基因表达的抑制持续时间也较短暂，在 4～5 天后 mRNA 的合成已完全恢复。在植物、线虫和果蝇中，直接注射长的 dsRNA 即能诱导特异的 RNAi 现象。在哺乳动物细胞中，大于 30nts 的 dsRNA 具有两个效应：①激活了 dsRNA 依赖的蛋白激酶（dsRNA2dependent kinase，PKR）和干扰素系统；②dsRNA 诱导合成多聚腺苷酸，激活非特异的 Rnase 和 RnaseL，在诱导 RNAi 现象的同时产生非特异性的基因表达抑制。因此在哺乳动物细胞中 RNAi 现象的研究一直没有取得较大进展，直到 2001 年 Elbashir 等发现小于 30nts 的 dsRNA 可以避免激活上述途径，他们把化学合成的 21nts siRNA 转入哺乳动物细胞中引发了目的基因表达封闭，RNAi 研究才取得进展。在哺乳动物细胞中，体外合成的 siRNA 诱导 RNAi 现象最多持续一周，通过构造表达载体，转入细胞后能不断表达 siRNA，引起持续的基因表达沉默，即能长期研究某个失去功能的基因，又能保存基因的信息，为研究基因功能和分化发育开辟了一条新途径。

2. 实验方法

诱导 RNA 干扰有很多种方法，各有其优缺点。

（1）化学合成法　应用最广泛但成本昂贵，体外合成的长 21nts、3′端带有 2 个游离核苷酸的 siRNA 较其他形式合成的 RNA 具有更大效率的降解目的 mRNA 的效果，游离核苷酸为核糖核酸，较脱氧核糖核酸具有更大的诱导效果，一个碱基的错配能明显降低干扰效率。

（2）siRNA 表达载体　在质粒或病毒载体中，利用 RNA 聚合酶启动子 U6 或 T7 分别控制有义链和反义链的合成，并退火形成双链 siRNA，或在启动子下游设计带发夹结构的表达单位，自身退火形成双链 siRNA。

（3）dsRNA 表达载体　多用于果蝇、线虫等低等生物，在体内表达后被 Dicer 切割成 21~23nts 的 siRNA；或在体外利用 Dicer、RNase Ⅲ 切割 dsRNA 产生 siRNA，纯化后使用；长的 dsRNA 在哺乳动物细胞中激发非特异性基因表达抑制，但有研究表明在鼠胚胎或胚胎细胞系中，长达 500nts 的 dsRNA 也能诱发特异的基因表达抑制。

3. RNAi 技术在基因功能和发育生物学研究中的优势

越来越多的物种基因组测序的完成提供了前所未有的大量信息，但这些信息如一部部“天书”，解析基因组中基因功能、基因的表达调控及基因之间的关系网络，是今后很长一段时期的任务。虽然生物信息学为预测基因的功能提供了快捷方法，但仍有相当多的基因无法预测其功能，这是因为生物信息学的分析方法也是建立在实验基础上的。然而，目前对于基因功能知识的积累还相当匮乏，并且生物信息学分析结果最终还是要通过实验来验证。在实验室中，研究基因功能的传统方法有定向克隆及转基因技术等正向遗传学（forward genetics）方法，以及基因敲除、反义技术及核酶技术等反向遗传学（reverse genetics）方法等。定向克隆和基因敲除有周期长、成本和技术要求高等缺点，而反义技术及核酶技术的抑制基因表达效率低，远远满足不了大规模基因功能研究的需要。RNAi 作为一种新的反向遗传学方法，由于具有如下优点，使其日益成为大规模高通量研究基因功能的强大武器。

（1）效率高。对基因表达抑制率达 90% 以上，能快速获得与基因敲除相近的缺失突变体表型，所需双链 RNA 的有效剂量低，甚至在单个细胞内只需几个分子的 dsRNA 即可强烈剔降基因表达，但仅见于少数物种（如线虫和植物）。dsRNA 在细胞内比单链 RNA 或 DNA 更稳定，作用更持久。RNAi 可实现在一个个体或一个细胞内同时沉默多个基因，也可以在个体发育的不同阶段沉默基因表达，在需要时又恢复基因的功能，因此操作可灵活多变。利用 RNAi 技术先封闭基因的表达，然后再激活，通过前后表型的变化，能方便地鉴定出基因的功能。

（2）特异性高。有两层含义：其一，只有针对编码区的 dsRNA 才能产生 RNAi，而针对内含子或启动子区域的 dsRNA 不能产生 RNAi。其二，指小干扰 RNA（small interference RNA，siRNA）与靶基因的结

合严格遵循碱基配对规律，siRNA 除反义链 3′末端两个尿嘧啶核苷不起识别作用外，序列中的任何一个碱基改变都可导致 RNAi 作用的大大减弱，甚至完全失效。但也有 RNAi 不完全遵循碱基配对规律而使基因沉默发生在翻译水平，需作进一步研究。

(3) 简便易行。人工合成，体外转录、表达载体等产生 dsRNA 的方法技术要求不高。

(4) 除人工合成外，相对于基因克隆及基因敲除产生 dsRNA 的成本较低。

(5) 适合于针对全基因组基因建立 siRNA 或其表达库 以上优点使 RNAi 非常适用于在全基因组水平系统研究基因功能，特别是结合生物信息学及基因芯片等技术，将极大地加速功能基因组研究的进程。RNAi 技术为研究发育过程中基因的功能提供了一个手段，能很容易地制造出突变型个体。Amdam 等把 dsRNA 注入囊胚前期的蜜蜂卵或初生蜜蜂腹内中，封闭 vitellogenin 基因的表达（vitellogenin 基因在成体后才出现表型），结果分别有 15% 和 96% 的个体出现突变型。15 天后，仍能检测到 dsRNA 片段。在进行反向遗传学研究时，RNAi 技术也能用来寻找药物治疗靶点。Makimura 等利用 RNAi 技术减少了丘脑下部 AGRP (agouti - relatedpeptide) 50% 的表达量，AGRP 使代谢率提高而不减少摄食量，从而减轻肥胖，为肥胖的治疗提供了一个靶点。为了明确 Fas 信号通路在肝疾病中的作用，在小鼠模型中，利用 RNAi 技术抑制 Fas 的表达，能明显降低自身免疫性肝炎引起的肝衰竭和纤维化，说明 Fas 在肝疾病中所起的作用。

4. **RNAi 技术在大规模基因功能研究中的应用**

RNAi 技术已经成功地用于各种生物体、各种组织细胞的基因功能研究，包括各种植物、真菌、低等和高等动物。RNAi 在线虫中被发现，线虫也是技术应用最成功的模式生物，这是由于在线虫中，无论用注射或喂食 dsRNA 与 siRNA ，还是喂食表达 dsRNA 的细菌，都能很容易诱导 RNAi 。特别是应用 RNAi 技术在线虫全基因组范围内筛选表型相关基因，为其他生物体功能基因组的研究提供了很好的范例。早在 2000 年，Fraser 与 Gonczy 等分别系统地研究了线虫第 1 号和第 3 号染色体

(线虫共有 6 条染色体)大多数基因的功能。Fraser 等所用方法是构建针对第 1 号染色体 2416 个基因的 dsRNA 细菌表达文库,基因覆盖率达 87.3% ,给线虫喂食细菌,诱导 RNAi 而获得基因功能缺陷表型。这种方法的优点是,能够快速地获得大容量的表达文库,并能简便地扩增和保存文库,便于二次使用,较常规 dsRNA 制备方法要简单得多。他们共鉴定出 339 个与生长发育及生殖表型有关的基因,占被测试基因总数的 13.9%,经生物信息学分析比较其同源基因,发现这些基因涉及物质和能量代谢、细胞周期、细胞结构、信号转导等。他们还发现,进化保守的基因更易于通过 RNAi 获得其缺陷表型,已知线虫中 19% 的基因与果蝇有同源性,然而却有 43% 具有 RNAi 表型的基因有同源性。Gonczy 等用体外转录的方法合成了针对线虫第 3 号染色体 2 232 个基因的 dsRNA(基因覆盖率达 96%),性腺注射 dsRNA,借助延时微分干涉相差(time2lap se differential interference cont rast,DIC)显微摄影技术动态观察胚胎细胞分裂过程,发现 133 个基因(约占 6%)与此有关。2003 年,Kamath 等用与 Fraser 同样的方法研究了线虫 16 757 个基因(占线虫全基因组基因总数的 86%)的 RNAi 表型,共鉴定出 1722 个基因缺陷表型,其中 2/3 为首次发现。这是第 1 次用 RNAi 技术大规模高通量研究全基因组基因的功能。Ashrafi 等用 Kamath 等建立的 dsRNA 细菌表达文库筛选与脂肪储存有关的基因,发现 417 个基因与脂肪储存有关,其中有许多脂肪代谢调节基因与哺乳动物中的同源。Lee 等利用 Kamath 等建立的 dsRNA 细菌表达文库筛选第一和第二号染色体上(共有 5690 个基因)与寿命有关的基因,发现约 15% 经 RNAi 鉴定与寿命相关的基因是线粒体的功能基因,线虫寿命的延长与 ATP 的生成及氧的消耗降低有关,但不总是与自由基生成降低有关。Paddison 等利用建立的短发夹结构 RNA (short hairpin RNA , shRNA)载体表达文库,对人类的 9610 个基因和鼠的 5563 个基因进行了研究,发现此方法可快速、大量地筛选到与人类疾病相关的功能缺陷蛋白。Berns 等利用建立的 shRNA 载体表达文库对人类的 7914 个基因进行了研究,发现参与 p53 途径中的另外 5 个新调节因子与细胞周期和细胞生长增殖密切相

关。目前，用 RNAi 研究其他生物体基因功能仍然以小规模或单基因的操作模式为主，这种模式显然不能满足功能基因组研究的需要。dsRNA 表达文库在线虫中的成功应用，对于其他生物体功能基因组的研究具有很好的借鉴作用。

5. RNAi 技术与基因芯片技术的优势结合

解析基因的功能必须同时考虑基因及其表达产物之间的广泛联系和相互作用网络，仅仅依靠 RNAi 是难于胜任的。基因芯片技术能够高通量地检测在特定条件下细胞所有基因的表达情况，把 RNAi 与基因芯片技术的优势结合起来，将能了解细胞内所有基因及其表达产物之间的相互关系，从而更全面、系统地解析基因的功能。先用 RNAi 技术在特定条件下下调或关闭某一基因的表达，然后利用基因芯片技术在全基因组范围内检测每次 RNAi 后所有基因的表达情况，以此了解被沉默基因与其他基因的关系。然后再沉默另一个基因，不断重复这样的工作，直至完成对全基因组所有基因的检测分析，总结出基因之间的网络关系。据报道，来自美国纽约冷泉港实验室癌症基因组研究中心的 Vivek Mit tal 博士目前正按照这个思路，致力于研究血管生成调控机制，以期发现有价值的药物作用靶点。Mousses 等巧妙地将 RNAi 与基因芯片技术有机地结合在一起，建立了所谓 RNAi 微阵列技术。他们将 siRNA2 脂质体复合物点在玻璃片上制备成含 siRNA 的微阵列，将细胞铺在玻璃片上进行反向转染，然后整合其他检测技术（如化学发光、显色、放射活性检测等）对 RNAi 结果进行分析。由于在一张玻璃片上能点成千上万个不同的 siRNA 点，因此能够高通量地研究基因功能。针对一个基因的编码序列可以设计出多条 siRNA ，但每条 siRNA 沉默基因的效能参差不齐，不同的 siRNA 与其效能之间仍没有明确的规律可循，常规的、盲目的 siRNA 筛选方法效率低下，严重阻碍了 RNAi 的应用，特别是在有干扰素反应的哺乳动物中的应用。为此，Mittal 实验室开发了一种能够针对任意基因快速筛选有效的 siRNA 或 shRNA 的半定量方法。Mittal 的方法与 Mousses 不谋而合，同样是基于微阵列的反向转染，通过检测报告基因的表达水平，判断不同 siRNA 或 shRNA 沉默目的基因的效能。

6. RNAi 技术在基因功能研究中的缺陷

RNAi 在基因功能研究中的表现并非完美，这是因为：①不同组织细胞或基因对 RNAi 的反应不一样，有的甚至拮抗 RNAi（如神经细胞、精细胞等），胚胎细胞对 RNAi 的反应也较低。组成型表达及高丰度表达的基因难于被沉默。能被转录但不表达蛋白质的功能基因能否被 RNAi 沉默也有待研究。在高等动物中，RNAi 沉默基因的效果往往难于达到基因敲除的水平，而理论上所有基因都可用基因克隆、点突变、转基因或基因敲除的方法研究其功能。因此，传统的方法仍然将在基因功能研究中发挥不可替代的作用。②RNAi 的作用是剔降与 dsRNA 或 siRNA 同源的基因表达，如果作用位点是保守序列，则有可能同时剔降几个基因的表达。因此，在全基因组范围内保证 RNAi 的特异性是必要的。③蛋白质的功能是在与其他组分（蛋白质、核酸、小分子化合物等）相互作用中体现出来的，特定的表型可能是某一蛋白质中的某一功能域的结果，而 RNAi 还无法特异地沉默某个功能域。④有些基因的功能表型还无法检测，如与神经活动有关的基因。⑤基因功能网络是一个复杂系统，干预其中一个或几个基因的功能有时并不出现可检测的表型变化，这也是其他基因功能研究方法还无法克服的困难，有待其他领域理论与技术的发展。但不管怎样，RNAi 技术应用于基因功能的研究正进行得如火如荼，基因功能的解析速度是过去所无法比拟的。

获得性功能研究

转基因技术是将外源基因导入早期胚胎细胞，使之整合于细胞基因组中建立携带该基因动物模型的技术。最早成功建立的转基因动物是转基因小鼠，转基因小鼠技术于 20 世纪 60 年代兴起，至 80 年代中期逐渐成熟。由于转基因小鼠的建立比其他大型转基因哺乳动物的建立要省时、省力，因此转基因小鼠作为生命科学研究的一个新体系已经得到越来越广泛的应用。

转基因技术关键是要实现外源基因的导入及整合。外源基因整合的

结果可能有以下情况：①能够有效地表达，且不影响动物的发育以及正常的生理功能。②不能有效表达，整合入动物细胞基因组中的外源基因无功能。③外源基因的整合导致动物细胞正常基因的失活或激活癌基因，致使动物不能正常发育、繁殖。

而1987年出现的“基因打靶”（gene targeting）技术实现了导入外源基因的定点整合，从而避免了外源基因随机整合对内源基因的影响；同时，人们还可以利用基因打靶技术定点灭活一个内源基因，即“基因敲除”（gene knockout）。然而，整合入的外源基因要随着生殖细胞的发育进入各种组织细胞，这样使外源基因的表达失去了组织特异性，无法研究某一基因在特异组织中的功能。但随着一系列组织特异性启动子的发现和应用，导入的外源基因逐步实现了在特定组织细胞内的表达。另外一个问题是，外源基因的导入可能影响动物的胚胎发育而导致动物在胚胎阶段死亡，因而必须要找到一种可以人为控制外源基因在特定发育阶段进行表达的方法。1993年有人利用重组酶系统实现了外源基因的时间特异性表达。这一系列的进展已能够在时空上控制特定外源基因的表达并观察其功能。

转基因技术为确定等位基因（cis - acting）的DNA序列提供了明确的实验方法，该DNA序列调控发育期动物的特异转录方式。另外，此技术为进一步研究特定位点控制小鼠发育基因产物的表达提供了途径。

1. 动物基因转移的常用方法

实现动物基因转移的方法很多，较成熟和常用的有显微注射法、胚胎干细胞法、嵌合体小鼠、核移植、逆转录病毒基因转移法和电脉冲法及质粒转染法等。

（1）显微注射法　显微注射技术的不断发展和完善依赖于以下3点：①显微操作系统的不断改进；②重组DNA技术的发展；③注射基因在宿主基因组中整合率的提高。

目前，基因转移最成功的方法是直接将DNA注入小鼠受精卵的原核（pronuclei）中。此方法可使外源基因稳定地整合入10%～40%的子代鼠染色体内。大多数情况下，整合发生在单细胞阶段（one - cell -

stage)，因此外源 DNA 在转基因动物包括原始干细胞的所有细胞内存在。另外，有 20%～30% 的转基因小鼠，外源 DNA 的整合发生较晚，这些鼠就成为嵌合体。整合的外源 DNA 序列拷贝数从一到几百不等，与注射进小鼠受精卵内的 DNA 分子数几乎没有关系。经常发现大量拷贝的整合发生在一个染色单体的位点上，但偶尔也可整合到两个不同染色体位点上。尽管某些整合比较复杂，但每个整合位点中外源 DNA 的拷贝基本按从头到尾的顺序排列。宿主基因组的整合位点似乎是多种多样的，而且大多数观点也认为这种整合是随机的，可发生在许多常染色体上，也可发生在性染色体上。随着靶向性 DNA 整合技术的发展，通过 DNA 显微注射可实现定点整合。近些年来转基因技术的迅速发展，已经实现了对外源基因的组织特异性表达和发育阶段特异性表达的控制。

某些实验，可能需要将转移基因导入胚胎干细胞系（ES 细胞系）产生嵌合体小鼠，而不是把基因注入小鼠受精卵中。这些实验包括：转移基因对胚胎具有显著性致死效应的实验；补偿 ES 细胞系中的一个突变并检测嵌合体小鼠中基因补偿作用的实验。另外，某些情况下，对相同转基因 ES 细胞系产生的嵌合体小鼠的转基因表达进行分析，可能比分析单纯的转基因系效率更高。

（2）胚胎干细胞法　胚胎干细胞（ES 细胞）是从哺乳动物囊胚的内细胞团中取出培养得到的。小鼠 ES 细胞研究工作开展最早，成果也很多，ES 细胞注入宿主囊胚，能参与胚胎发育并掺入嵌合体动物的生殖系；利用逆转录病毒基因转移法以及显微注射法可将外源基因导入 ES 细胞中，筛选出带有外源基因的细胞克隆，转入动物胚胎中参与发育。

（3）嵌合体小鼠　不同来源的八细胞期小鼠胚胎可以在体外重新组合，再移入母鼠体内经胚胎发育后产下的小鼠即为嵌合体小鼠。这种小鼠不同于品种间的杂交，它携带有两套截然不同但独立存在的遗传信息。嵌合体小鼠模型的建立，使得一系列发育生物学的研究得以开展，以阐明哺乳动物基因在不同发育阶段发挥的作用，并为今后转基因技术的不断完善奠定基础。

（4）核移植　通过核移植可将外源基因导入小鼠胚胎，但不能导

入特异克隆基因或突变基因。转基因技术已用于检测早期胚胎胞核的各项潜能，比较核与胞浆传递遗传缺陷能力的差别，以及分析母本（maternal）或父本（paternal）基因在早期发育中的作用。

（5）逆转录病毒基因转移法　另一个把基因导入鼠胚胎细胞系中的方法是用逆转录病毒载体转染鼠胚胎，野生株或稳定的重组逆转录病毒可转染植入前或植入后胚胎（pre - or post - implantation），使得病毒基因组稳定地整合入宿主染色体中。但逆转录病毒转移基因存在自身局限性：①生产高滴定浓度重组逆转录病毒需另外附加程序；②不能插入太长的外源 DNA 片断，否则会影响逆转录病毒的功能；③嵌合体及多拷贝插入的发生率较高；④导入逆转录病毒载体的基因表达较困难。然而在插入突变基因方面，用逆转录病毒或逆转录病毒载体转染还是有相当多的优点的，此方法允许转基因鼠的后代携带一个插入原病毒的单一而完整的拷贝，不会出现转基因插入中常有的重组或丢失，如 MoMuLV（Moloney 小鼠白血病病毒，一种 RNA 逆转录病毒）病毒转染的小鼠胚胎可发育成携带病毒基因的小鼠，并按孟德尔规律遗传给子代，MoMuLV 可以在成年小鼠体内被激活，并使小鼠发生白血病。

小鼠胚胎在着床前的阶段都可以浸泡在浓的病毒原液中，或者与产生病毒的单层细胞一起培养。另外，还可将病毒导入着床后的胚胎，即原肠期 8 ~ 12 天的胚胎。逆转录病毒能感染许多体细胞，但对生殖细胞的感染频率很低。这个方法的主要优点是技术操作简便易行，而且病毒基因可转移到发育的各个时期。

（6）转基因小鼠的应用　转基因小鼠为发育生物学许多领域提供了极有价值的研究模型，它的两个最常用之处是：①特异组织及特异发育阶段基因调控的研究；②转基因表达对表型影响的研究。

在有关转基因表达对表型影响方面的应用，包括对发育调节基因、激素和受体、肿瘤基因以及有关免疫识别和免疫应答的基因和病毒基因的研究。总之，转基因小鼠中外源基因表达可提供功能获得性突变，而许多相同基因中的功能丧失性突变仅可通过基因打靶产生。但是，通过一些外源基因的表达可获得负性突变型，已经有实验证实，编码反义 RNA 的外源基因的表达可成功抑制内源基因的表达。

另外，转基因小鼠还应用于细胞谱系的分离、新细胞谱系标记物的产生、体细胞和减数分裂重组的研究、诱变实验中底物的导入、克隆基因补偿突变的能力检测以及大动物中蛋白生产方法的改进等方面。

2. 转基因小鼠作为人类疾病的动物模型

人类疾病的动物模型广泛应用于探讨致病机制、研究和使用新的治疗方法等方面。然而，许多人类疾病并不发生于动物身上或仅仅发生在高等哺乳动物身上，因此使得研究者能够使用的模型少而昂贵。现在则可以利用转基因动物建立人类遗传疾病模型，也可通过基因打靶技术在ES细胞中诱导单个或多个基因突变，利用抗性标记筛选所需的ES细胞株，进一步利用由ES细胞参与形成的嵌合体动物建立人类疾病模型。下面列举一些转基因表达疾病模型的例子。

乙型肝炎（HBV）是一种缺乏可操作动力模型的人类疾病。将HB-sAg基因导入小鼠产生转基因鼠，用于模仿HBsAg在人肝中表达但不发病的带毒状态。而HBV全基因组、S基因、X基因的转基因小鼠在国际上均有报道。我国屠亚军等用显微注射法制备转基因小鼠，建立了人乙型肝炎病毒x（HBx）转基因小鼠模型，为从整体水平研究慢性乙型肝炎患者诱发肝癌的作用机制及HBx的反式激活作用机制提供了理想的动物模型。

丙型肝炎（HCV）是输血后肝炎及散发性非甲非乙型肝炎的主要类型，全球有2%~3%的人感染HCV，近70%人发展为慢性肝炎。长期慢性感染易导致肝纤维化、肝硬化，甚至原发性肝癌。由于缺乏稳定的感染细胞及实验动物模型，丙型肝炎发病机制的研究、抗病毒药物筛选及预防性或治疗性疫苗的研制都受到极大的限制。而上海第二医科大学在国内外率先建立了HCV转基因动物模型，以阐明丙型肝炎发病机制，该研究采用受精卵显微注射法导入HCV结构基因，成功建立稳定表达与诱导表达HCV结构基因的转基因小鼠，并发现HCV结构基因在小鼠发育早期高表达，可导致死胎；中度表达可致多脏器组织严重损伤；低表达或不表达时小鼠幸存；低表达小鼠6月龄后80%以上可发生肝细胞脂肪变性。因此认为HCV明显的细胞毒作用与其基因表达水平密切相关。

另外，通过JC病毒基因组的显微注射可诱导小鼠出现渐进性多灶性脑白质炎。而通过导入编码HTLV-1的酪氨酸转氨酶基因可在小鼠体内诱导出神经纤维瘤。

同时，还有许多已用于研究高血压的动物模型，如自发性高血压小鼠和盐敏感性高血压小鼠等。Mullins等1990年首次将小鼠肾互基因（Ren-2）注射于大鼠卵中，产生了因单一基因突变而致高血压的高血压鼠。研究发现，肝利用载脂蛋白-E（Apo-E）清除循环系统中的乳糜颗粒和极低密度脂蛋白（VLDL）等。Apo-E缺乏，可导致人类或动物的动脉粥样硬化。利用插入突变的方法破坏小鼠ES细胞中的Apo-E基因，出生的转基因小鼠血浆中胆固醇、甘油三酯的含量超过正常小鼠2~5倍，8个月后出现动脉粥样硬化的病症。另一种通过插入突变建立的疾病模型是Lesch-Nyhan病（HPRT缺乏），也是利用ES细胞建立起来的。这种动物模型的产生证明，利用插入突变的方法可以建立疾病模型。

第21对染色体上的铜锌超氧化物歧化酶（SOD1）基因是目前已知的唯一一个突变后可引起家族性肌萎缩侧索硬化（ALS）的基因。而G93A突变可使人类患ALS，而表达高水平突变SOD1（G93A）的小鼠产生的表型及疾病与人类的ALS相似。因此通过G93A突变可以构建变异的ALS转基因鼠。而且过度表达SOD1的G37R突变转基因小鼠也产生严重的进行性运动神经元病。导入小鼠SOD1、G86R（相当于人类的G85R）突变，可构建出另一种转基因鼠，G86R小鼠的脊髓、脑干、新大脑皮层的运动神经元亦呈现变性改变。这三种SOD1突变转基因鼠的共同特征是，具有较多突变SOD1基因拷贝数和较高活性的小鼠，瘫痪出现较早。变异的ALS转基因鼠模型的建立充分证明ALS的发病受突变的SOD1蛋白量的影响。

人类其他一些疾病，如亨廷顿舞蹈症等也已通过转基因技术建立了疾病模型。因而，转基因动物模型的建立为研究新药物、新疗法提供了方便。

3. 转基因小鼠作为基因治疗的模型

将基因插入到转基因动物中，可起到减轻病症的作用。如生长激素

缺乏的小鼠个体明显小，雄性小鼠没有生殖能力，将生长激素基因导入这些小鼠后，发现它们生长超过正常小鼠且雄性小鼠的生殖能力得到恢复。但由转基因起作用的生长激素释放模式似乎与雄性动物生殖能力的恢复并不相关。

而在 MHC 编码区基因缺失的小鼠不能对合成抗原 poly（Glu－Lys－Phe）产生应答。若将编码 Ia 的基因引入小鼠卵中，小鼠对于抗原的免疫应答能力将得到恢复。

另外，插入小鼠或人 β－globin 基因将减轻小鼠 β－库利贫血（β－thalassermia）症状。有趣的是，与转移小鼠 globin 基因相比，转移人 globin 基因产物能够与小鼠 α－链具有协同作用，因此在治疗库利氏贫血病症方面效果更好。

因此，转基因小鼠作为疾病基因治疗的模型被广泛应用，为基因治疗提供了有力的实验依据。

4. 转基因小鼠用于免疫学研究

免疫系统具有视自身物质为非抗原，但对外来抗原物质进行识别并产生应答的能力。近年来主要由于转基因小鼠的研究，使得关于免疫球蛋白（lg）以及组织相容性复合物（MHC）基因方面的分子遗传学研究信息剧增。

Ig 基因重排机制以及这一现象对于基因表达调控的重要性一直受到研究者的关注。近期有学者已将重排的 Ig 基因导入，产生转基因小鼠，发现将已重排的 κ－轻链基因进行显微注射，如果它能表达并分泌成熟的 Ig 分子，则内源 κ－轻链基因不能发生重排。而如果插入的 κ－轻链基因没有组装 Ig 分子，即细胞质中不存在转基因轻链时，内源基因就可以发生重排和表达。因为重链基因的同源排斥依赖于转基因产物与细胞膜结合的能力，将编码重链与胞膜结合成分的序列去掉后，再将已重排的重链基因导入细胞内，发现内源重链基因的功能没有被抑制。另外，还发现外源已重排的重链基因能够在 T 淋巴细胞中表达，表明 T 细胞本身不具备表达内源重链基因的功能，这说明 T 淋巴细胞缺乏 Ig 基因重排。但有趣的是，T 淋巴细胞能够重排 T 淋巴细胞受体基因，而此基因与 Ig 基因有许多共同之处。

免疫学中经典概念之一是，κ-基因的重排抑制了λ基因的重排（同型排斥）。而上述试验发现，在外源已重排的κ基因存在下，并非所有情况都导致同型排斥。这一发现产生另一种假设，即可能存在两种不同的B细胞谱系，一种可同时重排κ和λ两种基因，而另一种却只能重排其中一种基因。

动物的免疫反应由几组基因控制。一组是免疫球蛋白基因，它产生抗体；而另一组是免疫反应基因（Ir）。Ir属于Ⅱ类MHC，它编码一种糖蛋白，由两个链（α和β）组成，整合在细胞膜上，形成有功能的双体，协调巨噬细胞、T淋巴细胞和B淋巴细胞之间的相互作用，调节免疫反应。在某些小鼠品系中Ea链的5′端缺失，结果不能表达特殊的Ⅱ类产物I-E。将α单体型的有功能的Ea基因导入缺陷型小鼠的生殖系中，基因以组织特异形式表达，在脾中发现I-E抗原的mRNA。此外，用γ干扰素诱导I-Ea基因，发现该基因在巨噬细胞中表达。在Ea基因转移的研究中，人们发现雄鼠不传递基因，第一代带Ea基因的雌鼠能将基因传递给后代，但其子代不能传递基因。研究者们正深入研究，以确定MHC基因的表达与雌鼠生育力的关系。另外，Ⅰ类MHC基因产物与移植排斥有关，称为移植抗原。将猪的Ⅰ类MHC基因导入小鼠卵中，该基因可在出生的小鼠体内表达并遗传给后代。由于表达了足够量的猪Ⅰ类移植抗原，因此，在进行移植试验时，该小鼠的皮肤被正常小鼠所排斥。

Imoto Shion等报道，利用可诱导的Ⅱ类MHC基因的反义RNA建立小鼠的基因调控系统，启动子为人类MT-Ⅱa，结果发现转基因小鼠的B淋巴细胞发育推迟。

5. 转基因小鼠用于肿瘤学研究

由于培养的细胞系已经是一类被转化的细胞，将癌基因引入细胞系后，癌基因的转化潜能有可能被培养细胞的异常增殖能力所掩盖，因此，实际上培养细胞不适于进行癌基因转移的研究。因而目前，人们将癌基因或原癌基因显微注射到胚胎中，以研究它们对完整生命体中正常分化细胞的影响。这些研究的结果为了解肿瘤疾病以及它们与异常基因表达之间的关系提供了巨大的帮助。

除了直接导入肿瘤基因外，细胞原癌基因以及它们的转化体与各种不同的启动子连接后，也被注射到了小鼠中。带有小鼠乳腺瘤病毒（MMTV）启动子的 c－myc 癌基因经显微注射产生了一批转基因小鼠。这些小鼠在乳腺、睾丸和淋巴组织中产生肿瘤，证明原癌基因的畸变调节更易使生物体致癌。

转基因小鼠在癌基因研究中最主要的贡献之一就是对于癌基因致癌是“多步骤－出击”假说的支持。但目前仍不清楚“多步骤－出击”假说是否适用于动物体中所有的癌基因序列。

6. 转基因小鼠在发育遗传学上的应用

转基因小鼠的研究在了解生物发育及其遗传学方面有着重要的作用。早期的试验也证明，在受精卵发育为成熟个体的过程中，父本和母本的等位基因都是必不可少的。人们一直认为母本和父本基因的区别在于它们有不同的基化模式，从而导致了基因亚型活性的不同，反过来，也表现出两者在发育过程中的差别。另外，利用转基因技术可以很好地了解父本和母本基因在发育过程所起的作用。如由母本遗传得到的 HBsAg 基因表现出很强的甲基化作用和（或）很弱的表达；而当这些基因来自父方时，结果则相反。

外源 DNA 整合进 X 染色体，对于认识 X 染色体的失活作用机制提供了独特的视角。有研究发现转基因的长串连体结构能够避开 X 染色体的失活作用，这可能是由于它破坏了分布在 X 染色体中 GC 丰富区域的几何结构的缘故。

（胡成虎）

参考文献

[1] 成令忠. 组织学与胚胎学. 4 版. 北京：人民卫生出版社，1995
[2] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 北京：北京出版社，1995
[3] 郭长占，龙振洲. 转基因小鼠研究进展. 中华微生物学和免疫学杂志，2000，20（3）：278－282
[4] 胡以升，郝光荣. 基因工程小鼠//施新猷. 现代医学・实验动物学. 北京：人民军医出版社，200

[5] 金岩. 小鼠发育生物学与胚胎实验方法. 北京：人民卫生出版社，2005

[6] 金岩. 口腔颌面组织胚胎学. 西安：陕西科学技术出版社，2003

[7] 李素民，郑继旺. 基因敲除技术在药物成瘾机制中的应用. 北京：中国药物滥用防治杂志，2001，35（6）：242－246

[8] 刘忠华，张开镐. 基因敲除小鼠在药物依赖性研究中的应用. 北京：中国药物依赖性杂志，2001，10（2）：82－85

[9] 刘厚奇，张远强，周国民. 医学发育生物学. 北京：科学出版社，2004

[10] 屠亚军，琦祖和，杨鹏. 人乙型肝炎病毒 X 基因转基因小鼠模型的建立. 中国医学科学院学报，2000，22（3）：263－265

[11] 吴红. 基因敲除动物模型的建立. 北京：实验动物科学与管理，2002，19（1）：32－35

[12] Abbott BD, Harris MW, Birnbaum LS. Comparisons of the effects of TCDD and hydrocortisone on growth factor expression provide insight into their interaction in the embryonic mouse palate. Teratology, 1992, 45: 35－53

[13] Amdam GV, Simoes ZL , Guidugli KR , et al. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra－abdominal injection of double－stranded RNA. BMC Biotechnol, 2003, 3 (1): 1

[14] Aradhya S, Cherry AM. Array－based comparative genomic hybridization: clinical contexts for targeted and whole－genome designs. Genet Med, 2007, 9 (9): 553－559

[15] Ashrafi K, Chang FY, Watts JL , et al . Genome－wide RNAi analysis of Caenorhabditis elegans fat regulatory genes. Nature, 2003, 421 (6920): 268－272

[16] Baes MI, Declercq PE. Gel－shift analysis and identification of RXREs and RAREs by PCR－based selection. Methods Mol Biol, 1998, 89: 377－388

[17] Bass BL. RNA interference. The short answer. Nature , 2001 , 411 (6836): 428－429

[18] Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real－time quantitative PCR, how to use it and what is available. Methods, 2010, 50 (4): 244－249

[19] Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, et al. A large scale RNAi screen in human cells identifies new component s of the p53 pathway. Nature, 2004 , 428 (6981): 431－437

[20] Bejjani BA, LG Shaffer. Application of array－based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. J Mol Diagn, 2006, 8 (5): 528－533

[21] Brown T. Analysis of RNA by northern and slot－blot hybridization. Curr Protoc Immunol, 2001

[22] Breman AM, Bi WM, Cheung SW. Prenatal diagnosis by array－based comparative ge-

nomic hybridization in the clinical laboratory setting. Beijing Da Xue Xue Bao, 2009, 41 (4) : 500 - 504.

[23] Buck MJ, Lieb JD. ChIP - chip: considerations for the design, analysis, and application of genome - wide chromatin immunoprecipitation experiments. Genomics, 2004, 83 (3): 349 - 360

[24] Chen X, Jorgenson E, Cheung ST. New tools for functional genomic analysis. Drug Discov Today, 2009, 14 (15 - 16): 754 - 760

[25] Costa A, Osorio C, Dias S. MicroRNA expression profiling in bone marrow: implications in hematological malignancies. Biotechnol J, 2009, 4 (1): 88 - 97

[26] Creighton CJ, Reid JG, Gunaratne PH. Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. Brief Bioinform, 2009, 10 (5): 490 - 497

[27] Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. Genes Dev , 2003 , 17 (4): 438 - 442

[28] Donze O , Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. Nucleic Acids Res, 2002, 30 (10): e46

[29] Dufva, M. , Fabrication of DNA microarray. Methods Mol Biol, 2009, 529: 63 - 79

索　引

[General Information]
书名=生命之窗　生命科学前沿纵览　发育生物学
作者=张金山主编；鞠躬，陈志楠总主编；刘宏颀执行总主编
页数=240
SS号=13642210
DX号=
出版日期=2014.06
出版社=第四军医大学出版社